

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de Farmacología



TESIS DOCTORAL

**Actividad antiviral y antiinflamatoria de plantas medicinales:
aislamiento de polisacáridos activos**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Estefanía Patricia Hernández Benito

Directores

Paulina Bermejo Benito
María José Abad Martínez
Luis Miguel Bedoya del Olmo

Madrid, 2014



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA**

TESIS DOCTORAL

**Actividad Antiviral y Antiinflamatoria de
Plantas Medicinales: Aislamiento de
Polisacáridos Activos**

**Memoria que, para optar al grado de
Doctor en Farmacia, presenta:
Estefanía Patrícia Hernández Benito
Madrid, 2014**



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

PAULINA BERMEJO BENITO, PROFESORA TITULAR Y DIRECTORA DEL DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA DE LA FACULTAD DE FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID, **MARÍA JOSÉ ABAD MARTÍNEZ**, PROFESORA TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA DE LA CITADA FACULTAD Y **LUIS MIGUEL BEDOYA DEL OLMO**, PROFESOR AYUDANTE DOCTOR DEL DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA DE LA CITADA FACULTAD.

Certifican:

Que la presente Memoria que lleva por título “Actividad Antiviral y Antiinflamatoria de Plantas Medicinales: Aislamiento de Polisacáridos activos”, presentada por **Dña. Estefanía Patricia Hernández Benito**, ha sido realizada en este Departamento bajo nuestra dirección y asesoramiento, reuniendo todos y cada uno de los requisitos necesarios para optar al Grado de Doctor en Farmacia.

Concluido el trabajo experimental y bibliográfico, se autoriza su presentación para que sea juzgado por el Tribunal correspondiente.

Y para que conste, a los efectos oportunos, firmamos el presente en Madrid, 28 de Enero 2014.

Paulina Bermejo Benito
Directora de Tesis

María José Abad Martínez
Directora de Tesis

Luis Miguel Bedoya del Olmo
Director de Tesis

Este trabajo se ha realizado en el Departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, en colaboración con la Unidad de Inmunopatología del SIDA, del Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III, con el Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBMSO) y el Instituto Superior de investigaciones Biológicas (CIB), ambos pertenecientes al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)

Esta Tesis ha contado con la financiación de los proyectos D/011447/07; D/020523/08; D/025166/09 y D/031518/10 concedidos dentro de la convocatoria de ayudas para programas de Cooperación Interuniversitaria e Investigación Científica del Ministerio de Asuntos Exteriores y de Cooperación Española.

*Desde pequeña me han educado en la idea de que
jamás hay que rendirse ante nada, que con esfuerzo e
ilusión, las cosas se consiguen.
A mis queridos padres, por una vida de entrega total e
incondicional a sus hijos.
A mi hermana Ana, por su siempre caluroso ánimo y
su apoyo.
A Ibán*

*Un naturalista nunca padece esa horrible enfermedad llamada aburrimiento.
Salid, pues, al mundo de la naturaleza, saludadlo con curiosidad y gozo y
disfrutad de él.*

Gerald Durrell

Agradecimientos

Como gran amante del mundo natural que me rodea, lleno de enigmas que resolver, y en especial del mundo vegetal, tan lleno de sorpresas, me gustaría dejar constancia con este trabajo, que las maravillas de la naturaleza no se hayan confinadas únicamente en lugares exóticos, como las selvas tropicales, sino que si se buscan, están al alcance de la mano.

La realización de la Tesis ha sido una experiencia enriquecedora que me ha permitido crecer personal y profesionalmente. Son muchas las personas, que en mayor o menor medida e incluso no siendo muy conscientes de ello, han hecho posible que esto salga adelante, sin las cuales no podría haber llegado al final y a las que me gustaría mostrar mi agradecimiento.

En primer lugar, agradecer su trabajo y su contribución, a todos aquellos investigadores que desde hace mucho tiempo llevan dedicando sus esfuerzos a este ingrato estudio del aislamiento de principios activos, y que me han permitido y ayudado a mi también, a contribuir en este campo.

En este apartado debo destacar a mis Directores, por aceptarme como discípulo suyo, la Dra. Paulina Bermejo Benito, Directora del Departamento de Farmacología, por depositar plena confianza en mí, por su apoyo, sus incansables ganas de trabajar, su comprensión y sus consejos a nivel científico y personal, que tanto han significado para mí, y por brindarme su amistad. La Dra. Maria José Abad Martínez y Dr. Luis Miguel Bedoya del Olmo, antes amigo que compañero, por su ayuda y ánimo constante, que han hecho posible que me forme como investigador y a ser mejor persona. Además de vuestra discípula, me considero vuestra amiga.

Al Dr. Jose Antonio Molina del Departamento de Botánica, por compartir este mundo tan fascinante que son las plantas.

A la Dra. Alicia Prieto, y el Dr. Jesús Jimenez, del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), por acogerme en sus departamentos, como uno más, en especial a Alicia, “investigadora nata”, por todo lo que me ha enseñado, por su actitud tan activa, por su interés porque aprenda mas allá de lo que veo y estudio, por confiar en mí y por sus buenos consejos tanto científicos como personales, hemos creado una amistad inquebrantable.

Al Dr. Luis Carrasco, del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBMSO), del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y al Dr. Jose Alcamí, del Centro Nacional de Microbiología, del Instituto de Salud Carlos III, por abrirnos las puertas de sus laboratorios, y compartir la creencia de que la naturaleza tiene aún mucho que decir en la búsqueda del armamento antivírico.

Durante todos estos años he conocido a mucha gente, Eva, Ruben, Carla, Natalia, Irene, Pilar, Elena, M^a Angeles, Patricia, Vanesa, y los de fuera de España, Judit, Karim, Laura, Adriana, Raúl, Andrea, Tarek, (bienvenidas tus estimulantes infusiones rojas del desierto y tus dulces egipcios) y Jorge, gente muy diferente, que comparten conmigo su amor por observar, descubrir y constatar las maravillas que se producen en la naturaleza y me han transmitido su ánimo. Gracias a Ana, gran amante de la farmacognosia y una mano amiga que piensa como yo. Gracias a Jose, un gran compañero de batalla, siempre dispuesto a compartir sus conocimientos y su optimismo. Gracias a Luis, que ha sufrido junto a mí las venturas y desventuras de nuestras tesis y lo que les rodea, mostrando siempre su apoyo y comprensión.

Y no me olvido de los compis del CIB, Laura, Sara, Mónica, Jorge, Filipa, Jesús, y de Vívi, Mercedes e Isabel, con las que he compartido tantas comidas, momentos de relax para hablar sobre familia, trabajo, nutrición y dietética, noticias, fines de semana, y viajes varios...y algún que otro percance en el Consejo.

Y tampoco me olvido de Rosa, de agradecerle su buen manejo del material de laboratorio y su gran disposición para ayudar y escuchar nuestras desdichas.

Por supuesto, debo dedicar este esfuerzo a mi familia, padres y hermanos, en especial a mis padres, por darme la vida, por los valores que me han transmitido, por ser un ejemplo constante y porque me habéis apoyado siempre en todas mis decisiones. Gracias por creer en mí, sin duda no podría haber tenido mejores padres, os quiero mucho y sois mi mayor ejemplo. Gracias en especial a mi hermana Ana, por su apoyo y comprensión, por saber siempre lo que me pasa y darme las mejores palabras de aliento, por estar siempre dispuesta a escucharme y ayudarme, por animarme a continuar, y por los buenos momentos compartidos.

Gracias a mis “segundos padres”, Juan y Luchi, por cuidarme como una hija, y compartir conmigo tan buenos ratos, gracias Luchi por darme tu mano y tu cariño y animarme siempre a hacer todo lo que hago.

Y a mi marido, mi amigo mas querido, por tu amor y paciencia, por compartir tu vida conmigo, por animarme a culminar este proyecto, en esta etapa de nuestra vida y por todos esos sueños que tenemos juntos. A toda ésta, mi familia que me han apoyado incansablemente aún con su preocupación porque la lectura de la misma a través de los años no acababa de llegar y me han dado la oportunidad de descubrir lo que me gusta y de dedicarme a ello. Sin vuestro cariño y vuestro apoyo, ésta tesis no habría llegado a su fin.

Y por último, a aquellas personas tan queridas, que desde el cielo, seguro, están celebrando este momento.

A Todos Gracias

RESUMEN

Las plantas han sido utilizadas desde la antigüedad como remedios medicinales para curar enfermedades. Actualmente, muchas de ellas son recolectadas por etnobotánicos que investigan los recursos de las mismas como agentes antimicrobianos, antitumorales y su posible acción sobre el sistema inmunológico. Este material vegetal no constituye simplemente un reservorio de principios activos con actividad farmacológica, sino también un gran potencial para transformar los productos, por semisíntesis, en análogos más efectivos.

La entrada del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) en la célula, es la primera etapa del ciclo de replicación viral y una diana clave en la exploración de nuevos antirretrovirales, la intervención en este proceso, implica tanto a receptores celulares como a ligandos virales, pudiéndose llegar a detener hipotéticamente la infección y muerte celular.

El objetivo principal de este trabajo persigue el descubrimiento, obtención y caracterización de nuevos compuestos naturales de origen vegetal frente a virus, selectivamente frente a VIH, y en concreto agentes antivirales dirigidos a etapas tempranas del ciclo de replicación, con baja toxicidad y potencial uso como agentes terapéuticos, microbicidas.

Las tres especies vegetales, *Satureja boliviana* (Lamiaceae), *Phoradendron crassifolium* (Loranthaceae), y *Tuberaria lignosa* (Cistaceae), fueron recolectadas, desecadas y molturadas convenientemente para ser posteriormente establecer las características micrográficas y poder así garantizar su identidad. Mediante extracciones químicas secuenciales, a partir del extracto acuoso, se han obtenido los principales polisacáridos objeto de estudio, seleccionando para su posterior análisis, los de mayor actividad antiviral. Para conseguir nuestros objetivos se han utilizado diferentes métodos de aislamiento, purificación y elucidación estructural, entre ellos cromatografía de exclusión molecular, capa fina, cromatografía de gases CG-EM, espectroscopia de IR, y resonancia magnética nuclear RMN.

Se ha determinado “*in vitro*”, la capacidad antiviral de los extractos de las tres especies, en una batería de virus representativos, virus del Herpes Simple tipo I (VHS-1), virus de la Polio, virus de la Estomatitis Vesicular (VSV), y virus de la Inmunodeficiencia Adquirida (VIH), así como y de forma simultánea, la citotoxicidad de los mismos, utilizando para ello, líneas celulares y medios de cultivo adecuados. También se ha determinado y ya de forma selectiva, la actividad en VIH de las fracciones aisladas y purificadas de cada extracto, escogiendo para ello dos ensayos que miden la capacidad de los polisacáridos de inhibir la entrada del virus en la célula, se trata de los ensayos de inhibición de la infección en *Trans* mediada por células Raji DC-SIGN y de neutralización.

Asimismo se han realizado ensayos “*in vitro*” que determinan la capacidad antiinflamatoria tanto de los extractos, como de las fracciones polisacáridicas aisladas, analizando la capacidad de inhibir los mediadores de la inflamación NO y TNF α .

Los resultados obtenidos nos llevan a concluir que se trata de polisacáridos pécticos, que se unen, posiblemente por interacción electrostática inespecífica, al receptor gp-120, desestructurando la partícula viral, e inactivando su capacidad infecciosa, y además se trata de polisacáridos que modifican a la baja dos citoquinas proinflamatorias muy importantes, y esto indica junto con la baja citotoxicidad protección de la mucosa.

Los resultados obtenidos tanto de capacidad antiviral como de capacidad antiinflamatoria, de estos polisacáridos pueden ser de gran interés, en la búsqueda de métodos preventivos para la infección por vía sexual del VIH, ya que actualmente no es posible erradicar la infección una vez establecida y se está abriendo una puerta a estos métodos de prevención de la enfermedad a través de microbicidas, que aplicados de forma tópica sobre las mucosas puedan evitar la infección y sean seguros y eficaces.

SUMMARY

Medicinal plants have been used since ancient times to prevent and treat diseases. Currently, most of them are collected by ethnobotanists to find out their antimicrobial or antitumoral action or their immunological properties. These plant materials are not merely a reservoir of pharmacological active molecules since we can chemically modified them to obtain new molecules with higher potencies or different activities.

Human immunodeficiency virus (HIV) entry in human cells is the first step of viral replication cycle and it is a crucial target in antiretroviral therapy. It implies cellular receptors and viral targets so we could theoretically stop viral infection.

The principal objective of this work is to discover, obtain and characterize new natural compounds against several virus, including HIV, targeting early steps of viral replication cycle without showing any toxicity and, thus, able to be formulated as microbicides.

Three vegetal species, *Satureja boliviana* (Lamiaceae), *Phoradendron crassifolium* (Loranthaceae), and *Tuberaria lignosa* (Cistaceae), were collected, air dried and pulverized and then subjected to a micrographic study to guarantee their identity. Through chemical extractions from an aqueous extract, we have obtained several polysaccharides. To achieve our objectives we have used several methods for polysaccharides purification, isolation and structural identification, among them column chromatography, gas chromatography, IR spectroscopy and nuclear magnetica resonance (NMR).

Afterwards, we have tested polysaccharides against several virus, including Herpes Simple Virus type 1 (HSV-1), Poliovirus, Vesicular Stomatitis Virus (VSV) and HIV-1. Concurrently, toxicity was determined for each polysaccharide and cell line used. When antiviral activity was high, specific antiviral assays to determine the exact mechanism of action were used, such as DC-SIGN trans- infection of HIV-11 or Neutralization assays, all of them targeting the viral entry step.

Moreover, since inflammation is highly correlated to susceptibility to viral infection through sexual intercourse, we hace tested the anti-inflammatory properties of isolated polysaccharides against NO and TNF alpha production.

Results show that we are dealing with pectic polysaccharides targeting HIV-1 gp-120 possibly through electrostatic interactions, inactivating infectious viral particles. Moreover, these polysaccharides down regulate proinflammatory cytokines, suggesting and antiinflammatory effect on mucosa.

Antiviral and antiinflammatory properties of these polysccharides could be of great interest in the search of preventive methods to avoid sexual transsmision of HIV-1, since viral infections is not eradicated with current antiretroviral therapies. Non-toxic and active on several virus polysaccharides could become active principles of natural microbicides developed to be applied topically in vaginal or rectal mucosa to avoid viral infection without toxic effects.

ABREVIATURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxiribonucleico
AR	Artritis Reumatoide
ARN	Ácido ribonucleico
AINE	Antiinflamatorio no esteroideo
BSA	Albúmina sérica bovina, del inglés " <i>bovine serum albumine</i> "
BSTFA	Bis-trimetilisilil trifluoroacetamida
CAM	Complejo de ataque a membrana
CC	Cromatografía en columna
CCF	Cromatografía en capa fina
CETAVLON [®]	Bromuro de cetiltrimetilamonio
CG	Cromatografía de gases
CG-EM	Cromatografía de gases- Espectrometría de masas
CI ₅₀	Concentración inhibitoria 50
CMV	Citomegalovirus
COX	Ciclooxigenasa
CPH	Complejo mayor de histocompatibilidad
Da	Dalton
DMSO	Dimetilsulfóxido
ECP	Efecto Citopático
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético
IFN	Interferón
IL	Interleucina
IP	Inhibidor de la proteasa
IR	Infrarrojo
ITINNs	Inhibidores de la Transcriptasa Inversa No Nucleótidos
ITIANs	Inhibidores de la Transcriptasa Inversa Análogos de Nucleótidos
IT	Inhibidor de la transcriptasa
LPS	Lipopolisacárido
LT	Leucotrieno

MAF	Herbario de la Facultad de Farmacia
MEM	Medio Esencial Eagle
µg	Microgramos
mL	Mililitros
mg	Miligramos
M	Molar
MTT	Bromuro de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium
nm	Nanómetros
NMDA	N-Metil-D-Aspartato
NO	Óxido Nítrico, " <i>Nitric Oxide</i> "
NOS	Óxido Nítrico Sintasa, " <i>Nitric Oxide Synthase</i> "
PAF	Factor Activador de Plaquetas
PBS	Suero bovino fetal
Pm	Peso molecular
P/V	Peso/Volumen
PC	<i>Phoradendron crassifolium</i>
PS	Polisacáridos sulfatados
Rf	Factor de retención
RMN	Resonancia magnética nuclear
SB	<i>Satureja boliviana</i>
SEC	Cromatografía de exclusión molecular, " <i>size exclusion chromatography</i> "
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
TARGA	Terapia antirretroviral de gran actividad
TFA	Trifluoroacético
TI	Transcriptasa inversa
TL	<i>Tuberaria Lignosa</i>
TNF-α	Factor de necrosis tumoral α
Ufp	Unidades formadoras de placa
UV	Ultravioleta
UV/Vis	Ultravioleta-Visible
VHS	Virus Herpes Simple
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
VSV	Virus de la Estomatitis Vesicular

INTRODUCCIÓN

Introducción

Los virus son los responsables de aproximadamente el 20% de las enfermedades del mundo, de ellos, los retrovirus, representan casi el 8-10 %. El empleo de compuestos antivirales en la quimioterapia y quimioprofilaxis de las enfermedades virales es una adquisición relativamente reciente, sobre todo si se compara con la experiencia de más de sesenta años de quimioterapia antibacteriana. Como consecuencia, el actual armamento antiviral es todavía pequeño y limitado al tratamiento de unos pocos virus específicos, además de ser fármacos en general muy tóxicos por ello, la búsqueda de nuevos agentes antivirales esta plenamente justificada.

Las plantas han sido utilizadas desde siempre como remedios populares para curar enfermedades y dolencias. La peculiaridad y complejidad de los metabolitos secundarios de las plantas, hacen que cada especie vegetal, constituya un potencial arsenal terapéutico de nuevos fármacos . Estructuras químicas tan diversas como proteínas, terpenoides, cumarinas, xantonas, alcaloides, flavonoides, taninos y polisacáridos, pueden ser elaboradas por especies tan alejadas filogenéticamente como algas, Gimnospermas y Angiospermas.

En Marzo de 1988, a instancias de la Organización Mundial de la Salud (WHO), de la Unión para la Conservación del Mundo (IUCN), y de la Fundación Mundial de la Naturaleza (WWF), tuvo lugar en Chiang Mai, Thailandia, la Conferencia Internacional sobre la Conservación de las Plantas Medicinales. De ella, emanó la Declaración de Chiang Mai, donde se reafirmaba el uso esencial de las plantas en cuidados primarios de salud, se advertía, de las consecuencias de la pérdida de biodiversidad vegetal, de la extinción de las plantas medicinales por la destrucción de su hábitat y el desarrollo no sostenible, de la pérdida de posibles nuevos fármacos, de la pérdida de culturas indígenas, y de la necesidad de cooperación internacional. (Leaman *et al.*, 2001)

En la actualidad, se siguen tres criterios diferentes en la búsqueda de plantas que sean potencialmente útiles para la industria farmacéutica. El primero de los métodos consiste en una selección de especies *al azar* en una región determinada, sin tener en cuenta ni sus afinidades taxonómicas, ni sus usos tradicionales. Este tipo de búsqueda sin dar excesivos éxitos permitió el descubrimiento del taxol. Los otros dos métodos se incluyen en los denominados “dirigidos”. En las búsquedas de tipo *filogenético* se intentan localizar plantas que estén emparentadas con plantas conocidas por tener compuestos útiles conocidos. Así, una vez conocido que ciertas especies de

Solanáceas, Apocináceas o Euforbiáceas contienen sustancias interesantes, se buscan otras especies diferentes de la misma familia haciendo la suposición previa que tendrán compuestos activos semejantes. En las búsquedas de tipo *etnobotánico* se escogen plantas usadas por las culturas locales para su estudio. La etnobotánica nos permite conocer toda clase de información acerca del uso sobre las plantas, actualmente muchas de ellas son recolectadas por etnobotánicos que investigan los posibles recursos de las mismas como agentes antimicrobianos, antitumorales y su posible acción sobre el sistema inmunológico. Este material vegetal no constituye simplemente un reservorio de sustancias y principios activos con actividad farmacológica (antiparasitaria, insecticida, antifúngica ó antibacteriana por mencionar alguna) sino también un gran potencial para transformar por hemisíntesis las moléculas aisladas activas en análogos más efectivos.

Numerosos estudios han documentado la importancia y el potencial de los productos naturales y de las plantas medicinales en el descubrimiento y desarrollo de fármacos en las décadas de los años 80, 90 (Henkel *et al.*, 1999), (Cragg *et al.*, 1997). Durante los últimos 10-15 años, la industria farmacéutica relegó los estudios con materiales vegetales haciendo mas hincapié en los estudios de química combinatoria de librerías de compuestos. Y aunque es verdad que estos métodos han sido usados con éxito en el desarrollo de nuevos fármacos, sin embargo muy pocos se identifican de *novo* (Newman & Cragg, 2007). Pero aun así, en el área de los antiinfecciosos, la incidencia de moléculas aprobadas desde productos naturales, origen microbiano fundamentalmente, es muy superior al de otras áreas farmacológicas. La falta de nuevas moléculas registradas, con la denominada crisis de nuevas moléculas patentables, si además, añadimos la pérdida de patentes por parte de la industria farmacéutica y el desarrollo de poderosas herramientas analíticas basadas en genómicas, proteómicas, bioinformática y otras biotecnologías y la unión con robustos estudios etnobotánicos y etnofarmacológicos desde las Medicinas tradicionales han revitalizado los estudios con plantas medicinales (Ngo *et al.*, 2013) (Kingham *et al.*, 2011), (Li & Vederas *et al.*, 2009).

Estudios realizados por diferentes grupos de investigación, ponen de manifiesto la eficacia de los extractos vegetales en el tratamiento de las infecciones víricas, habiendo sido aprobado en 2006 por la FDA un extracto de té verde enriquecido en catequinas para el tratamiento de las verrugas genitales (Chen *et al.*, 2008), (Polansky & Itzkovitz, 2013)

La investigación básica con plantas en la búsqueda de nuevas moléculas capaces de formar parte del arsenal terapéutico, es responsabilidad junto con otros, de los

Departamentos de Farmacología de las Facultades de Farmacia. Actualmente, una de las líneas de investigación que se sigue en nuestro Departamento va encaminada a identificar plantas con actividad antiviral y antiinflamatoria, así como al aislamiento y elucidación de aquellos principios activos que pudieran ser responsables de estas actividades.

Las plantas que se investigan en la presente Tesis Doctoral surgen de los resultados previos positivos que obtuvimos de actividad antiviral con los extractos de partida, cuyas experiencias fueron desarrolladas al amparo de un proyecto de investigación concedido en 1998 por la Comunidad Autónoma de Madrid (CAM) dentro del campo de las Ciencias de la Salud titulado “*Actividad frente al virus de la inmunodeficiencia humana y citomegalovirus de fitofármacos y plantas medicinales de la CAM, Bolivia y Ecuador*”. Este proyecto incluyó plantas procedentes de la Península Ibérica y plantas procedentes de América del Sur; en concreto, se incluyeron plantas de origen ecuatoriano y boliviano que se incorporan a nuestro departamento dentro del programa CYTED (Ciencia y Tecnología para el Desarrollo) en el marco del 5º Centenario del Descubrimiento de América, establecido entre Hispanoamérica y España. Todo este material vegetal ha sido objeto de estudio en proyectos de Cooperación subvencionados por la Agencia Española de Cooperación Internacional desde el año 2005 ininterrumpidamente hasta 2012.

Las especies incluidas en el presente trabajo son: *Satureja boliviana* Benth., (*Lamiaceae*), *Phoradendron crassifolium* Urban., (*Loranthaceae*), y *Tuberaria lignosa* (Sweet) Samp., (*Cistaceae*). Esta última, seleccionada en base a la pertenencia del proyecto citado y al proyecto *Actividad anti-VIH in vitro de plantas españolas, familia Cistaceae. Aislamiento de principios activos* financiado en el 2004 por la Comunidad Autónoma de Madrid.

OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo persigue el descubrimiento, obtención y caracterización de nuevos compuestos naturales de origen vegetal frente a virus, selectivamente frente a VIH, y en concreto agentes antivirales dirigidos a etapas tempranas del ciclo de replicación, con baja toxicidad y potencial uso como agentes terapéuticos.

Para intentar dar respuesta a estas cuestiones realizaremos:

1. Determinación de la eficacia *in vitro* de nuevos agentes antivirales frente a una batería de virus representativa, de dos especies Bolivianas y una Española, *Satureja boliviiana*, *Phoradendron crassifolium* y *Tuberaria lignosa*, respectivamente.
2. Fraccionamiento de los extractos activos frente a virus, aplicando técnicas específicas para el aislamiento de polisacáridos
3. Determinación del perfil toxicológico tanto de los extractos activos, como de las fracciones activas aisladas
4. Determinación *in vitro* de la actividad anti-inflamatoria a través de la evaluación de mediadores de la inflamación
5. Aislamiento y elucidación estructural de las fracciones activas frente a virus
6. Determinación de la eficacia *in vitro* en etapas tempranas del ciclo de replicación, intentando dilucidar el mecanismo de acción

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

VIRUS

1. Introducción

Los virus constituyen el grupo de agentes infecciosos de menor tamaño. Son parásitos intracelulares estrictos y presentan una estructura y un mecanismo de replicación elemental. La estructura más simple está constituida básicamente por un solo ácido nucleico, rodeado de una cubierta proteica, y pueden presentar además una envoltura. Por otra parte, los virus no son sensibles a los antibióticos que actúan en etapas específicas del metabolismo de las bacterias.

2. Morfología y estructura

El virión o partícula vírica, consiste en un genoma de ácido nucleico envuelto por una cubierta protéica o cápside, que constituye la nucleocápside y que puede estar “desnudo” o “envuelto” por una cubierta. El virión puede contener también enzimas esenciales u otras proteínas.

Los virus más simples consisten en ácido desoxiribonucleico (ADN) que puede ser monocatenario o bicatenario, lineal o circular, o ácido ribonucleico (ARN), que puede ser de sentido positivo(+), negativo(-), bicatenario(+/-), o ambisentido (regiones positivas y negativas unidas).

La cápside es una estructura protéica compuesta por subunidades que proporcionan protección y vehículo de transporte para la transmisión del virus de un huésped a otro, y para la propagación interna hasta la célula diana, su alteración y eliminación. La envoltura es una membrana compuesta de lípidos, proteínas y glucoproteínas. Esta estructura solo puede ser mantenida en soluciones acuosas. Se rompe con facilidad por desecación, acidez, detergentes y éter; esto inactiva el virus. Los virus con envoltura se mantienen en estado húmedo y se transmiten habitualmente a través de fluidos, gotitas respiratorias, sangre y tejidos; en cambio, los virus desnudos son resistentes a desecación, detergentes y ácidos, se transmiten sobre todo vía fecal-oral y se propagan incluso en aguas residuales.(Strauss *et al.*, 2008).

2.1 Virus sin envuelta

La cápside se forma por el ensamblaje químico de proteínas individuales que dan lugar a unidades progresivamente mayores, como son los protómeros, capsómeros y por último protocápside o cápside reconocible.

Las estructuras más simples son simétricas y son formaciones helicoidales (mosaico de tabaco) e icosaedros (picornavirus y parvovirus).

Las unidades protéicas se unen para formar capsómeros, que hacen relieve en la superficie de la partícula. Los icosaedros por lo general resultan de la agrupación de cinco unidades en los vértices, donde confluyen cinco triángulos y se forman doce

capsómeros pentámeros o pentones, número que se mantiene constante. Los capsómeros son estructuras huecas, con forma esférica (adenovirus) o más frecuentemente de prisma (herpesvirus). Algunos virus icosaédricos y los de estructura más compleja pueden contener debajo de la cápside una nueva proteína interna, que en la mayoría de los virus no presenta estructura definida. (Strauss, JH et al 2008).

2.2 Virus con envuelta

Los herpesvirus, togavirus y poxvirus son ejemplos de virus con envuelta que difieren en cuanto a forma, tamaño y complejidad.

La envoltura del virión es de naturaleza proteica-lipídica y puede estar dotada de proyecciones o espículas de glicoproteínas, las cuales en su mayoría actúan como proteínas de adherencia vírica (PAV) capaces de unirse a estructuras de células diana. (Strauss et al., 2008)

3. Ciclo de replicación

La célula huésped actúa como “fábrica” que proporciona los sustratos, energía y maquinaria necesarios para la síntesis de proteínas. Los procesos no proporcionados por la célula deben estar codificados en el genoma del virus. El resultado de la competencia entre el virus y la célula por la maquinaria biosintética, determina el destino de la célula afectada y la naturaleza de la infección vírica.

Los pasos en la replicación se repiten en todos los virus y son:

3.1 Reconocimiento y adherencia a la célula diana

Se produce una interacción entre las PAV y determinados receptores en la célula; esto va a determinar si la célula puede o no ser infectada. La célula diana define el tropismo tisular (virus neurotrópicos o linfotrópicos).

3.2 Penetración

Después de múltiples interacciones, se inicia la internalización del virus, que depende de la estructura del virión y del tipo de célula. Los virus con envoltura generalmente entran por endocitosis mediada por receptor, que es un proceso celular normal para captar hormonas, lipoproteínas etc. También puede fundirse la envoltura con la membrana y se pone en contacto la nucleocápside directamente con el citoplasma. El pH juega un papel importante y es un factor determinante para la fusión del virus.

3.3 Denudación

Una vez dentro de la célula, la nucleocápside ha de llegar al lugar de replicación y perder la cápside o envoltura. El genoma de los virus ADN (excepto poxvirus), debe introducirse en el núcleo, mientras que la mayoría de los virus ARN permanecen en el

citoplasma. El proceso se inicia por adhesión al receptor y es favorecido por el medio ácido de las proteasas incluidas en los lisosomas o endosomas.

3.4 Transcripción y replicación del genoma vírico

La transcripción, la traducción y la replicación del genoma vírico son los pasos más importantes, en los que los virus deben fabricar ARN mensajero, (ARNm), proteínas y una copia idéntica de su genoma. Una vez introducido el genoma vírico, debe ser transcrito en ARNm funcionales, capaces de unirse a ribosomas y ser traducido en proteínas. El mecanismo depende de la estructura del genoma y el lugar de replicación.

3.5 Maduración

El fenómeno de maduración o integración es poco conocido. Se sabe que las proteínas virales deben transportarse a ciertas áreas de la célula donde se inicia la formación del nucleocápside.

La adquisición de la envoltura ocurre después de asociarse la nucleocápside con regiones de la membrana celular modificadas por glucoproteínas víricas. Conforme se producen más interacciones, la membrana rodea la nucleocápside y el virus sale de la membrana por gemación.

Durante el ensamblaje se producen errores, como que se originan viriones vacíos y otros con genomas defectuosos.

3.6 Liberación

Los virus pueden ser liberados desde las células por lisis celular, exocitosis o gemación desde la membrana plasmática. Los virus con cápside desnuda se liberan después de la lisis de la célula. La liberación de algunos virus con envoltura se produce tras gemación desde la membrana plasmática.

En los virus que son liberados por gemación, el lugar donde ésta se produce lo determina el tipo de genoma y la secuencia proteínica de las glucoproteínas. La mayoría de los virus ARN salen por gemación desde la membrana plasmática, y el virus es liberado de la célula al mismo tiempo.

Los virus liberados al medio extracelular son responsables de nuevas infecciones, aunque también por fusión célula-célula y por transmisión vertical del genoma a las células hijas, se difunde la infección. Algunos herpesvirus, retrovirus y paramixovirus son capaces de inducir la fusión intercelular para crear elementos gigantes multinucleados (sincitios). Los retrovirus pueden transmitir verticalmente la copia integral del genoma a las células hijas durante la replicación celular.

4. Patogenia

La infección vírica de una célula puede conducir a tres resultados:

- Infección fracasada o abortiva

- Muerte celular o infección lítica
- Multiplicación vírica sin muerte celular o infección persistente no lítica.

La replicación del virus inicia cambios en las células que conducen a citolisis, modificación de las propiedades funcionales o en las características antigénicas de las células. Los efectos pueden deberse a la utilización de la maquinaria celular para obtener macromoléculas, a la acumulación de proteínas y partículas víricas, o a la incorporación de glucoproteínas a las membranas.

1. Virus del Herpes Simplex

1.1 Introducción

La familia *Herpesviridae* está constituida por virus ADN de doble envoltura originada en la membrana nuclear de la célula huésped, una cápside y un ADN bicatenario. El Virus del Herpes Simple (VHS) pertenece a la familia *Herpesviridae*, subfamilia *Herpesvirinae*, género *Simplexvirus*.

La familia de herpesvirus que afecta a los humanos consiste en ocho especies separadas : Virus Herpes Simple 1 (VHS-1), Virus Herpes Simple 2 (VHS-2), Varicela Zoster Virus (VZV), Citomegalovirus (CMV), Epstein-Barr Virus (EBV), Virus del Herpes Humano 6 (VHH-6), Virus del Herpes Humano 7 (VHH-7) y Virus del Herpes Humano 8 (VHH-8). (Chisholm & Lopez, 2011).

Diferencias entre Herpesvirus Humanos					
<i>Herpesviridae</i>	Célula diana	Foco latencia	Diseminación	Cultivos celulares	
				Tipo de célula	Crecimiento
Herpes simple tipo 1 (VHS-1)	Mucoepitelial	Neuronas	Contacto intimo	Variados	Rápido
Herpes simple tipo 2 (VHS-2)	Mucoepitelial	Neuronas	Contacto intimo	Variados	Rápido
Varicela Zoster (VZV)	Mucoepitelial	Neuronas	Respiratorio, Contacto intimo	Escasos	Lento
Citomegalovirus (CMV)	Monocito, Linfocito, Células epiteliales	Monocito, Linfocito	Transfusiones, Contacto intimo, Transplante tisular	Escasos	Lento
Epstein-Barr (VEB)	Linfocito B, Células epiteliales	Linfocito B	Contacto intimo ("Enfermedad del beso")	Escasos	Lento

Tabla 1. Principales herpesvirus de importancia humana y sus diferencias . Adaptado de Pumarola *et al.*, 1995; Murray *et al.*, 2009.

Aunque los herpesvirus suelen causar enfermedad benigna, pueden provocar morbilidad y mortalidad significativas, sobre todo en neonatos, e individuos inmunocomprometidos. Los VHS a menudo causan infección orofaríngea, infección dermatológica, infección genital y oftálmica. También inducen meningitis y encefalitis, especialmente en neonatos y niños. El VHS puede infectar el sistema nervioso central y causar infección latente de por vida. La recurrencia da lugar a lesiones persistentes y severas, que son refractarias a tratamientos repetitivos con quimioterapia, o en inmunocomprometidos, tales como pacientes con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) o pacientes transplantados.(Wang *et al.*, 2010)

Los dos tipos de virus, VHS 1 y 2, comparten muchas características, como es la homología en su ADN, determinantes antigénicos, tropismo tisular y síntomas de la enfermedad. Aunque históricamente, herpes labial y herpes genital se han asociado con HSV-1 y HSV-2, respectivamente, recientes investigaciones han descrito que estos virus se están presentando más frecuentemente en determinados grupos de población. (Roberts *et al.*, 2003).

1.2.Estructura del virión

Tienen ADN lineal de doble hebra, encerrado en una cápside icosaédrica, tegumento proteínico y envuelta lipídica. (Chisholm & Lopez, 2011). La partícula vírica es de 150 a 200 nm.

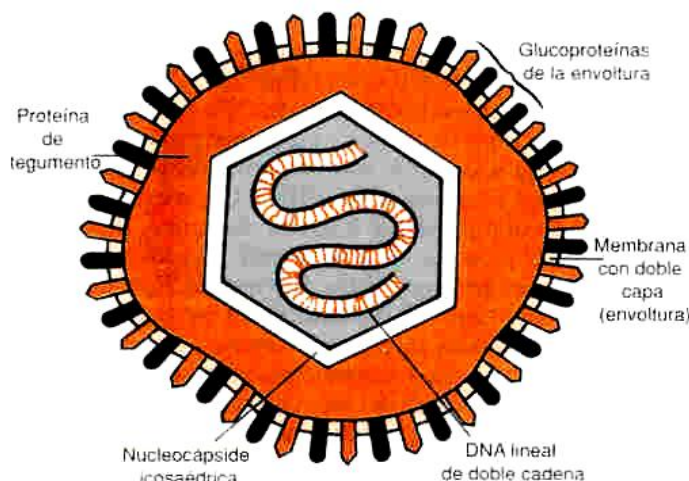


Figura 1. Esquema de un VHS tipo 1 .Roberts, *et al.*, 2003

Los herpesvirus codifican varias glucoproteínas con funciones de adherencia, fusión y escape inmune. El espacio entre envuelta y cápside es el tegumento que contiene proteínas y enzimas víricos. Como todos los virus con envuelta, son sensibles a los ácidos, solventes, detergentes y a la desecación.

1.3 Ciclo replicativo

La vía principal de penetración es la fusión con la membrana superficial de la célula. El virión libera una proteína que favorece la iniciación de la transcripción de genes. La nucleocápside se libera en el citoplasma, al fundirse la envoltura con la membrana plasmática, o con las membranas vesiculares. La nucleocápside se une con la membrana nuclear y libera el genoma en el núcleo, donde se produce la transcripción y replicación. (Díaz-Ramón *et al.*, 2008)

Tras la adsorción y penetración del virus, éste pierde su envoltura y penetra en el núcleo. El ADN libre comienza a codificar la síntesis de los ARNm virales. Éste dirige la síntesis de tres proteínas de unión a ADN, importantes para la transcripción de los genes), Aunque el ciclo de replicación ofrece muchas oportunidades para el desarrollo de estrategias antivirales, la única diana de éxito en la terapia antiherpética sigue siendo la replicación del DNA a través de análogos de nucleósidos. (Wang *et al.*, 2010)

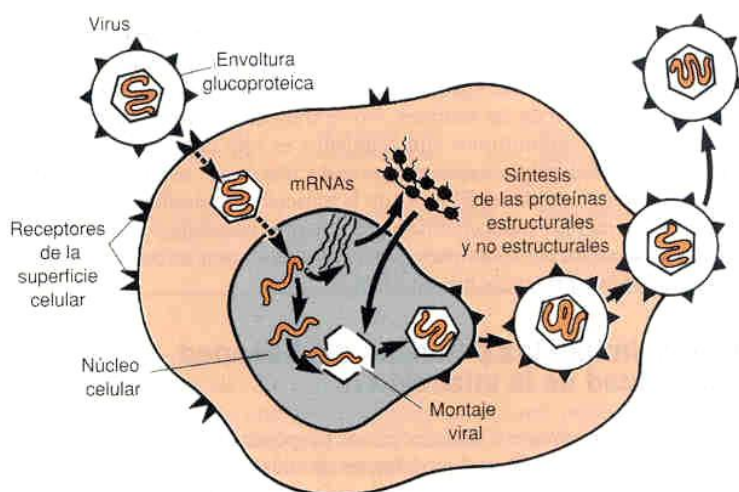


Figura 2. Ciclo de replicación del VHS, Murray *et al.*, 2009

1.5. Patogenia

La transmisión generalmente se produce por contacto oral directo en el VHS-1, y por contacto genital, orogenital o genitoanal en el VHS-2. La infección perinatal es posible en ambos virus. El periodo de incubación varía de dos a doce días.

La localización más común del cuadro por VHS-1 se halla en boca y labios; la replicación acontece en células epiteliales, hasta que se desarrolla la erupción en superficies en forma de vesículas y úlceras confluentes o no, más o menos dolorosas y molestas, que pueden persistir hasta dos semanas; a menudo afecta también a folículos pilosos y glándulas sebáceas, pudiendo provocar una foliculitis. (Chisholm & Lopez, 2011). El virus asciende por los nervios sensoriales periféricos, localizándose latente en los nervios sensoriales de la raíz dorsal de la mandíbula o ingle; más tarde, puede descender hasta los nervios provocando brotes adicionales. La fiebre y la

adenopatía cervical suelen acompañar la lesión mucosa. En niños, las vesículas aparecen en labios, mejillas, lengua y paladar; en adultos, puede además aparecer una intensa faringitis o amigdalitis, similares a las producidas por estreptococos β -hemolíticos.

Entre las causas de reactivación de estos virus, se encuentran estímulos inespecíficos, tales como infecciones febriles, traumatismos, radiaciones solares o ultravioletas, neurectomías, modificaciones hormonales e incluso shocks emocionales.

Esta aceptado en la literatura, que el VHS es un factor implicado en enfermedades orales. Se ha sugerido que VHS-1 esta asociado con ulceraciones repetitivas en la boca o aftas, que pueden desembocar en una gingivoestomatitis, cuando el virus alcanza la orofarige.

2. Virus de la polio

2.1. Introducción

Pertenece a la familia *Picornaviridae*, que incluye Enterovirus y Rinovirus. Los picornavirus producen en el hombre enfermedades como parálisis grave, meningitis aséptica, pleurodinia, miocarditis, hepatitis, lesiones cutáneas vesiculares y exantematosas, etc. (Pumarola *et al.*, 1995),(Romero *et al.*,2008),(Murray *et al.*, 2009). El virus de la polio es el agente causante de la poliomieltis, enfermedad infecciosa aguda que en su forma grave afecta al sistema nervioso central y produce destrucción de las motoneuronas dando lugar a una parálisis fláccida.

2.2 Estructura del virión

El virión está constituido por una cápside icosaédrica de 60 subunidades regulares o protómeros. Cada protómero está constituido por cuatro polipéptidos: VP1, VP2, VP3 y VP4.. El genoma está constituido por ARN lineal de tira sencilla y sentido positivo (ARN+). El genoma es infeccioso por si mismo, y puede iniciar la replicación del virus. (Strauss *et al* 2008)

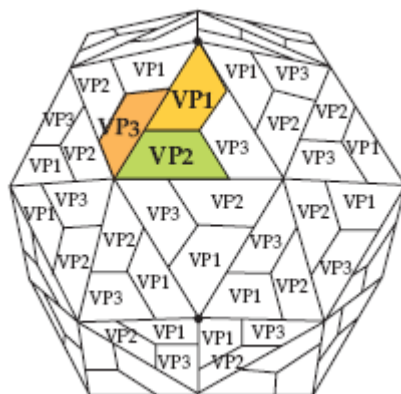


Figura 3.Estructura del virión de Poliovirus. Strauss *et al.*.,2008

2.3. Ciclo replicativo

La proteína VP1, contiene una estructura en forma de cañón por donde se une el receptor. El sitio de unión está protegido de los anticuerpos del huésped, constituyendo un sistema de escape del sistema inmunitario del huésped.

Tras la unión con el receptor, se libera VP4 que debilita el virión. El virus es internalizado por endocitosis. Se producen cambios conformacionales en el virión que desemboca en la liberación de ARN viral al citoplasma. El genoma ARN⁺ se une a los ribosomas, desde donde inicia su replicación, sintetizando los componentes necesarios para formar viriones nuevos; es decir, la nueva progenie viral. El ARN viral tiene capacidad para replicarse y para funcionar como ARN mensajero, traduciéndose a la gran proteína, llamada poliproteína, utilizando la mayoría del genoma (aproximadamente el 90%). Esta poliproteína es el precursor de las proteínas víricas. La poliproteína inmediatamente se rompe, por acción de las proteasas, y da lugar a proteínas más pequeñas; cuatro estructurales que forman la nucleocápside y otras que no son estructurales, y no forman parte del virión, pero son necesarias para la replicación viral y para inhibir la síntesis de componentes celulares. Entre las proteínas no estructurales está la ARN polimerasa vírica, que será la encargada de dirigir la síntesis de las cadenas nuevas del genoma viral, el VP la sintetiza porque en la célula no existe ninguna enzima con esa actividad.

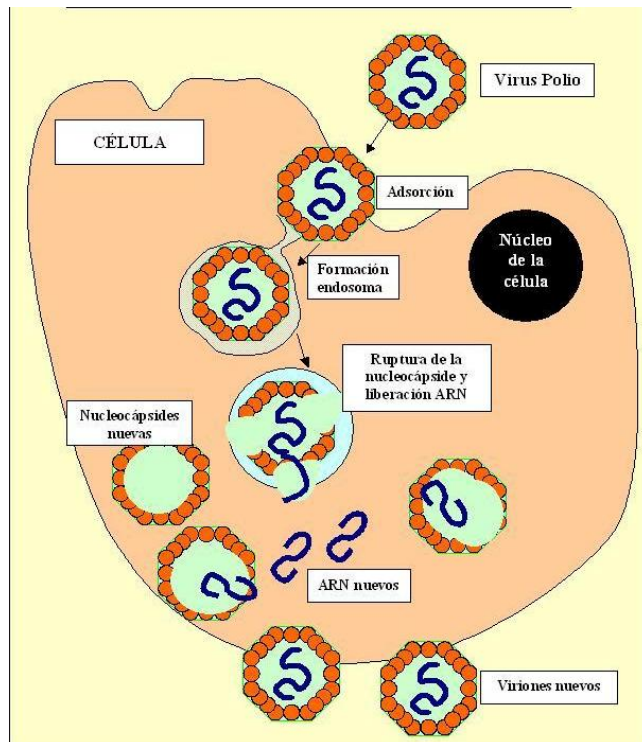


Figura 4. Ciclo de replicación del virus de la Polio.
www.viriomedica.blogspot.com

Por acción de la ARN polimerasa vírica, cada molécula del ARN positivo vírico se copia a una cadena complementaria de ARN negativo, que será utilizado como molde para volver a ser copiado a una cadena nueva de ARN positivo. De esta forma, la información genética es copiada íntegramente originando cadenas casi idénticas nuevas del genoma viral original. Este ciclo se repite muchas veces, mientras que la infección permanezca.

2.3. Patogenia

El virus ingresa por vía digestiva replicándose en la mucosa intestinal, y se disemina por el tejido linfático. Más tarde, penetra en el torrente circulatorio e invade todos los órganos; en la mayoría de casos se detienen en ese punto pero, según la virulencia de la cepa y la susceptibilidad del huésped, el virus se extiende hasta la médula espinal o tronco cerebral, donde infecta y destruye neuronas provocando parálisis. La muerte de las neuronas motoras trae como consecuencia la pérdida de la innervación y la función motora de las fibras musculares, apareciendo de esta manera la parálisis flácida.

Posteriormente, viene la fase de recuperación en la que aparecen nuevos brotes axonales de las neuronas motoras vivas, La apariencia final de las secuelas tempranas en el paciente depende directamente de la eficacia de este proceso de recuperación.

El virus de la polio sólo infecta al ser humano, y todos los grupos de edad son susceptibles, no obstante, a medida que han avanzado los esfuerzos de erradicación por parte de la Organización Mundial de la Salud (OMS), han disminuido las bolsas de infección activa, en todo el mundo.

3. *Virus de la estomatitis vesicular*

3.1. Introducción

El virus de la estomatitis vesicular (VSV, del inglés “*Vesicular Stomatitis Virus*”) pertenece a la familia *Rabdoviridae*, que incluye especies patógenas para mamíferos, peces, aves y plantas. Pertenece al género *Vesiculovirus* y es propio del ganado (caballos, gatos, cerdos); en humanos se da en zonas rurales y produce síntomas similares a la gripe.

El virus más importante de ésta familia por su acción patógena, es el virus de la rabia, que ha estado produciendo muertes hasta la introducción de la vacuna por Pasteur.

El virus de la rabia y el VSV comparten muchas propiedades bioquímicas y morfológicas. Debido a que el VSV replica con gran rapidez en cultivos celulares y es fácilmente purificable, se ha estudiado minuciosamente. Puesto que ambos tienen características comunes, el VSV se considera un modelo para la discusión de la estructura y replicación del virus de la rabia.

3.2. Estructura del virión

Presenta forma de proyectil y una envoltura con espículas o puntas, compuestas por un trímero de glucoproteínas, proteína G o proteína de adherencia vírica generadora de anticuerpos neutralizantes. La nucleocápside, que es helicoidal, se enrolla de forma simétrica en una estructura parecida a un cilindro; esto le da un aspecto estriado.

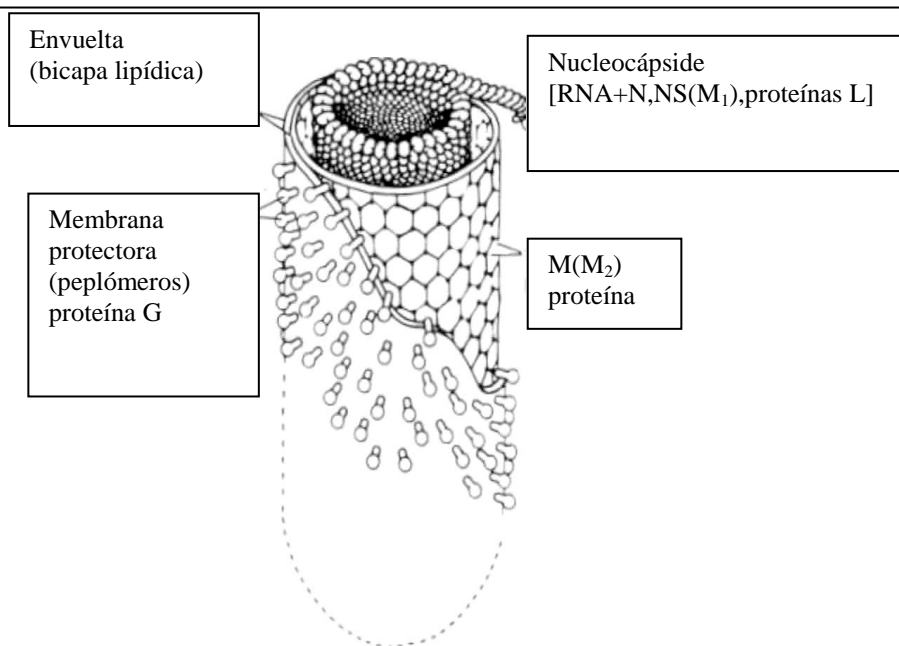


Figura 5. Esquema de una partícula del VSV. Murphy *et al.*, 1995.

La nucleocápside se compone de una molécula de ARN monocatenario negativo, una nucleoproteína (N), una proteína grande (L) y proteínas no estructurales (NE). Por último, aparece la proteína de la matriz (M), situada entre la envoltura y la nucleocápside..

3.3. Ciclo replicativo

La adsorción está mediada por la unión de la proteína G con la célula huésped, y la penetración se efectúa por endocitosis. El pH ácido de la vesícula induce la fusión de la envoltura vírica con la membrana plasmática.

Durante la replicación vírica, aparecen masas de nucleocápsides como cuerpos de inclusión citoplasmáticos, denominados corpúsculos de Negri, que se identifican por inmunofluorescencia específica.

El ensamblaje se produce en dos fases: ensamblaje de la nucleocápside en el citoplasma, y envoltura y liberación en la membrana plasmática celular, la salida del virus se realiza por gemación y es liberado cuando se ha envuelto totalmente la nucleocápside.

3.4. Patogenia

La infección se adquiere por la mordedura o contacto con secreciones de un animal rabioso, en un periodo prodrómico típico de cuatro días. El rabdomiovirus es transportado por los nervios periféricos al sistema nervioso central, donde se replica propagándose por todo el cuerpo y descendiendo por los nervios periféricos. En la

rabia paralítica, se observa una notable inflamación y necrosis del tronco cerebral y médula espinal. Al cabo de dos semanas, sobreviene el estado de coma y muerte.

Los individuos no vacunados que se infectan, no producen el número suficiente de anticuerpos a tiempo para prevenir la infección y la muerte. Los anticuerpos pasivos y la vacunación forman parte del tratamiento postexposición.

4. Virus de la Inmunodeficiencia Humana

4.1. Introducción

El VIH (acrónimo de Virus de Inmunodeficiencia Humana) es el virus causante del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Según el Comité Internacional de Taxonomía de Virus, el VIH se incluye en el género *Lentivirus*, encuadrado en la subfamilia *Orthoretrovirinae* de la familia *Retroviridae*.

El SIDA junto con la neumonía, es una de las enfermedades infecciosas con mayor índice de mortalidad. Hasta hace pocos años, era la principal causa de muerte en personas de 25-45 años, y es la primera causa de muerte en países como Namibia, Botswana, Mozambique, Lesotho, Malawi, Sudafrica y Zambia.(con mas del 10% de los adultos infectados) (de Cock *et al.*, 2012). El número de huérfanos debidos al SIDA en África subsahariana, se incrementó de 6,5 millones en 2001, a 11,7 millones en 2007 (Smith JH *et al.*, 2010). Desde el inicio de la epidemia, se han notificado en España un total de 77.953 casos de SIDA. En 2008, 33,4 millones de personas en el mundo vivían con SIDA, y ese mismo año se registraron 2,7 millones más. En España, se diagnosticaron 1.342 casos de SIDA; tras alcanzar su cenit en la década de los 90, el número de casos ha ido disminuyendo, gracias a la cobertura de nuevos tratamientos antirretrovirales, pero a pesar de ello España sigue siendo uno de los países con mayor incidencia de SIDA en Europa Occidental.

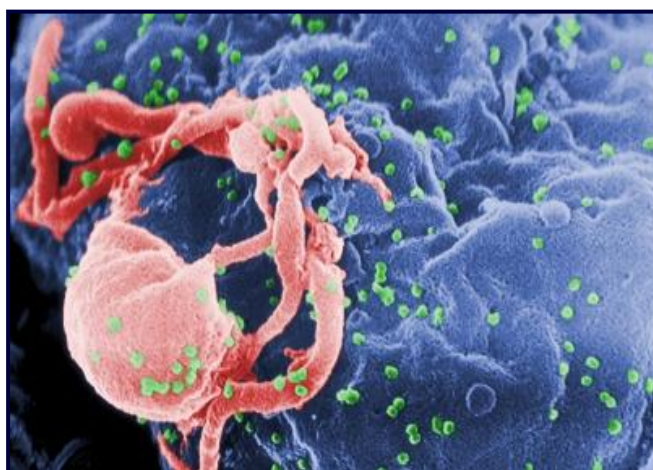


Figura 6. Viriones del VIH-1 ensamblándose en la superficie de un linfocito. www.cdc.gov

Los retrovirus están constituidos por un ARN que se copia en ADN bicatenario para integrarse en el núcleo de la célula huésped; por lo tanto, su material genético es ARN en la partícula viral y ADN cuando se encuentran en la célula que infectan. El proceso de conversión de ARN en ADN es una característica principal de los retrovirus que se lleva a cabo mediante acciones enzimáticas secuenciales; la propiedad de replicarse a través de la transcripción inversa les da su nombre, pero esta propiedad la comparten otros virus animales, como los que producen la hepatitis B y virus vegetales.

4.2. Estructura del virión

El VIH es una partícula esférica con un diámetro entre 80 y 110 nm de diámetro. Esta partícula presenta tres capas concéntricas:

La capa interna contiene una especie de nucleoide similar a un cono truncado, constituido por dos copias de ARN monocatenario que forman el genoma del virus; estas copias de ARN monocatenario, se relacionan con dos moléculas de retrotranscriptasa (p64) y proteínas del nucleótido (p10), una proteasa (p32) y una integrasa. La capa intermedia es la nucleocápside icosaédrica constituida por una capa de una proteína denominada p17, y una capa interior de una proteína llamada p24. La capa externa o envoltura es una bicapa lipídica; está constituida por la inserción de 72 glucoproteínas del virus constituidas por gp120 y gp41, y por una alta concentración de proteínas celulares entre las que destacan antígenos de histocompatibilidad de clases I y II (HLA I y HLA II, del inglés "*Human Leukocyte Antigen*"). La gp41 es una molécula transmembrana que cruza la bicapa lipídica de la cubierta vírica. (Kindt *et al.*, 2007)

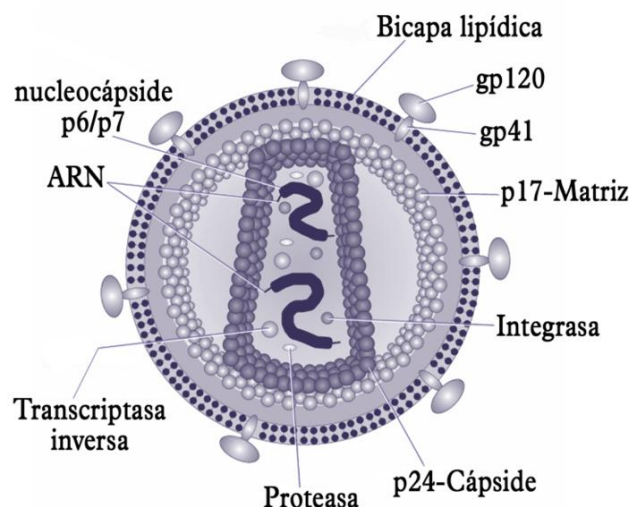


Figura 7. Dibujo de la estructura del virión en VIH. www.taringa.net

El genoma del VIH-1 es un ARN de cadena única o monocatenario, constituido por dos hebras idénticas de 9,8 kb y de polaridad positiva, que posee diferentes genes que codifican distintas proteínas.

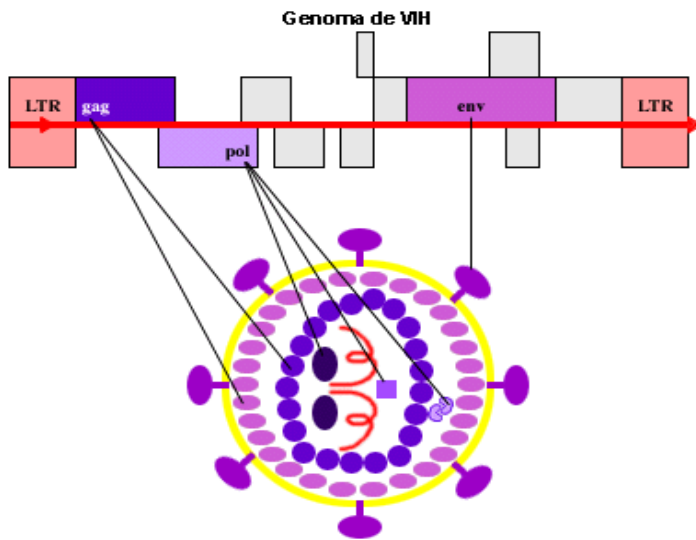


Figura 8. Genes implicados en codificar los componentes de la partícula vírica. www.maph49.galeon.com

Existen genes encargados de codificar los componentes de la partícula vírica *gag*, *pol* y *env*, (genes estructurales) y de regular la expresión de los mismos *tat*, *rev* y *nef* (genes reguladores).

Los tres genes principales que codifican las proteínas respectivas correspondientes a los antígenos internos, son comunes a todos los retrovirus y son los que se denominan ***gag*** (de grupo), ***pol*** (polimerasas) y ***env*** (envoltura).

De los genes estructurales, el gen *gag* codifica las proteínas del core (proteínas internas de la nucleocápside), el gen *pol* codifica, fundamentalmente, las enzimas como la transcriptasa inversa (TI), proteasa (PR), integrasa (IN) y ribonucleasa, y el gen *env* codifica las proteínas para la unión de CD4 y fusión de membranas, es decir, las proteínas de la envoltura vírica. Entre las funciones principales del *gag*, se encuentra la de constituir la mayor parte de la estructura del virión participando en la síntesis de ADN y su integración, además de contribuir al ensamblaje de las partículas víricas y su salida de la célula. El gen *pol* participa en la síntesis de ADN y su integración en el genoma celular, mientras que el *env* participa en la asociación y entrada del virus en la célula, por lo que se considera como el antígeno de entrada.

Entre las proteínas reguladoras las más importantes son las *Tat* y *Rev* que son esenciales para la replicación del virus; la *Tat* actúa como transactivadora de todas las proteínas y la *Rev* como procesadora del ARNm y su transporte selectivo en el citoplasma.

Uno de los principales elementos que intervienen en la regulación de la transcripción viral es el llamado factor nuclear kappa B (NF- κ B, del inglés "*Nuclear Factor- κ B*") que son una familia de proteínas que regulan la transcripción de varios genes celulares implicados en los procesos de activación y reconocimiento inmunes. Este factor no existe en forma activa en los linfocitos CD4 en reposo y es inducido sólo en los procesos de activación inmune.

Se ha descrito que los cuatro genes, *nef*, *vif*, *vpu* y *vpr*, están implicados en varios aspectos de la evasión del sistema inmune innato y adaptativo; además, esta inmunomodulación viral de genes ha sido reconocida para otros virus como herpesvirus y poxvirus, tanto en cultivos celulares *in vitro*, como en infecciones naturales *in vivo*. (Malim, & Emerman, 2008). En definitiva, estas proteínas accesorias modifican el entorno local sin infectar células, para asegurar la persistencia viral, así como su replicación, diseminación y transmisión.

4.3. Ciclo biológico

El ciclo biológico del VIH se divide en dos fases: temprana que acaba con la integración del ADN proviral en el genoma de la célula hospedadora, y la fase tardía que implica la transcripción del genoma viral y la generación de la progenie viral. La adsorción de la partícula viral, fusión, internalización, decapsidación, transcripción inversa e integración formarían la fase temprana, mientras que latencia, expresión temprana de genes reguladores, expresión tardía de genes estructurales y enzimáticos, morfogénesis y salida de la partícula viral, la fase tardía. (Greene, *et al.*, 1991).

Para que el VIH penetre en la célula, se debe producir la fusión de las membranas viral y celular. La entrada del VIH-1 en la célula se produce por la interacción del virus con al menos dos tipos de receptores. El receptor específico y común a todos los VIH-1 es una proteína que se encuentra en la superficie de las células diana, y que se denomina molécula CD4. Se cree que esta molécula CD4 (no es lo mismo que linfocito CD4) es específica y eficiente, ya que la afinidad de la gp120 viral por la CD4 es mayor que la afinidad de ésta por su ligando natural, una molécula del HLA-II.

Las principales células que poseen este receptor son los linfocitos y los monocitos/macrófagos (CD4+), aunque '*in vitro*' otros tipos celulares pueden ser infectados por el VIH y no todos ellos poseen la molécula CD4 (CD4-). Los linfocitos CD8 no expresan en condiciones normales el receptor CD4, pero se sabe que tras la infección de determinados virus como el HHV-6, si pueden expresarlo.

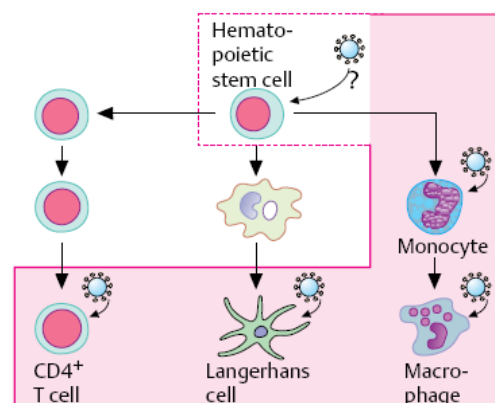


Figura 9. Células susceptibles de infección por VIH-1. Color Atlas of Immunology. Burmester *et al.*, 2003

Este reconocimiento no es posible sin ayuda de correceptores propios de las células susceptibles de ser invadidas; en el caso de los macrófagos son los CCR5, y en el caso de los linfocitos T, los CXCR4, que interactúan con la proteína superficial. Macrófagos y linfocitos T tienen en común su principal receptor: el receptor CD4. Este reconocimiento es condición obligada para que el virus llegue a penetrar en la célula, que va seguido de un cambio conformacional en la proteína gp120. (Gatell *et al.*, 2011).

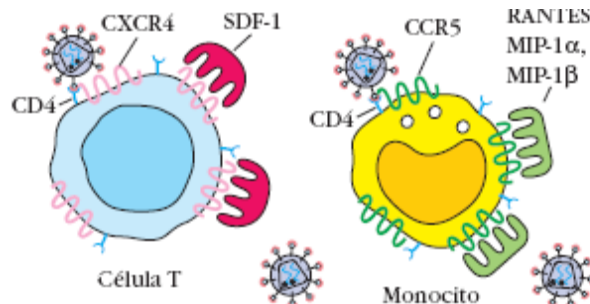


Figura 10. Correceptores presentes en las células T (CXCR4) y en los monocitos (CCR5). Inmunología de Kuby 2007

Conocer la estructura de las proteínas *env* es crucial para entender el proceso de entrada del VIH en la célula huésped. La gp120 y gp41 son sintetizadas como un polipéptido precursor, gp160, el cual es cortado durante el tránsito a la membrana celular. La subunidad gp120 de *env* media el ataque y presenta un elevado grado de variabilidad genética en HIV-1 aislados. La valoración de la secuencia aminoacídica de diferentes VIH-1 nos lleva a la identificación de 5 regiones variables (V1-V5) y cuatro constantes (C1-C4) en gp120. El uso de los correceptores CCR5 y CXCR4 por VIH-1 está determinado por la secuencia de aminoácidos de gp120, especialmente de V3 y V1-V2., las regiones conservadas forman el core de gp120 y contienen muchos de los dominios críticos para unirse a las células huésped. En contraste, los dominios variables son localizados cerca de la superficie de gp120, con V1-V4 forman un bucle expuesto que es anclado a sus bases por puentes disulfuro (el bucle variable), junto con numerosos sitios de glicosilación, lo que provoca constantemente el desarrollo de epítomos para la respuesta inmune humoral. Pero su función no es estrictamente la evasión inmune: el bucle V1/V2 y particularmente V3 tienen un importante papel en la unión a los correceptores. La subunidad de *env* gp41 codifica la maquinaria molecular que conduce a la fusión de la membrana. La proteína contiene un largo ectodominio extracelular, un ancla transmembrana y un largo dominio citoplasmático en el interior de la membrana del virión. El ectodominio contiene un péptido hidrofóbico de fusión N-terminal y dos dominios hepta-repetidos (HR1 y HR2) que son críticos en el proceso de fusión. (Tilton & Doms, 2010)

La interacción inicial entre el VIH y la célula, puede ser facilitado por interacciones no específicas entre dominios con carga positiva en gp120, y proteoglicanos con carga negativa en la membrana celular, o por interacciones específicas con lectinas de la superficie celular unidas a proteínas tales como DC-SIGN. El primer receptor para HIV es CD4, un miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas (IGs) que es expresado en monocitos, macrófagos, y en menor medida células T y células dendríticas. La interacción con CD4 ocurre en una estructura conservada de gp120. A diferencia de otras regiones de gp120, los sitios de unión con CD4 consisten es sitios altamente conservados y desprovistos de carbohidratos, propiedades que hacen de ello una lógica diana para los inhibidores de la unión

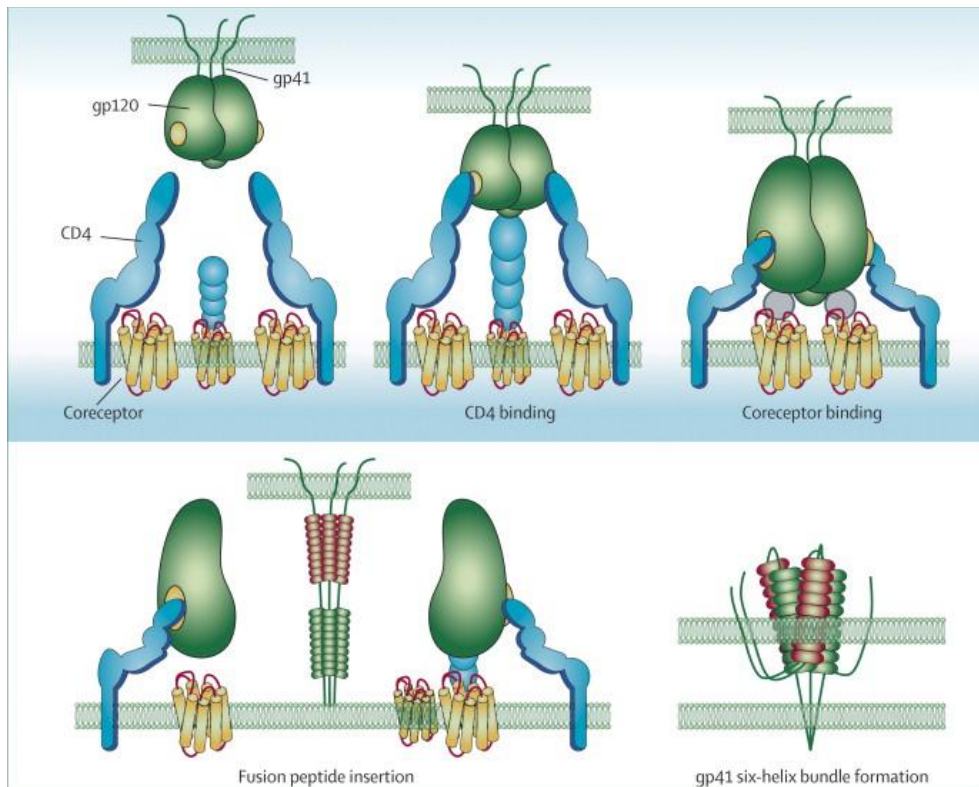


Figura 11. Mecanismo de entrada del VIH -Unión CD4-gp120 (sitios de unión color amarillo); unión de los coreceptores (zonas grises), gp120 sufre un cambio conformacional, CD4 induce epítopos que pueden unirse a receptores de quimocina, a continuación gp41 es liberado en una conformación fusogénica y sus hélices N-terminal y C-terminal forman una estructura que conduce a la aproximación de membrana viral y celular que acaban fusionándose. Esté *et al.*, 2007.

En humanos, el coreceptor primario del VIH-1 son los receptores de quimiocinas CCR5 y CXCR4, miembros de la familia de receptores acoplados a proteína G (Figura 24). Estas proteínas están integradas en la proteína de membrana con siete hélices transmembrana, un término N-extracelular, y tres bucles extracelulares que forman un pequeño bolsillo. Esos receptores N terminales de

quimiocinas contienen residuos de tiroxina sulfatada, y elementos en el interior y alrededor del bolsillo, que son críticos para la unión a gp120.




	CD4	CCR5	CXCR4
Structure	 Four Ig-like domains	 Seven transmembrane domains G-protein coupled receptor	 Seven transmembrane domains G-protein coupled receptor
Function	Coreceptor for MHC class II during stimulation of T-helper cells	Receptor for CCL3 (MIP1- α) CCL4 (MIP- β) CCL5 (RANTES) Redundant system	Receptor for CXCL12 (SDF-1) Non-redundant system
Expression	CD4+ T cells Macrophages Microglia Dendritic cells	A subset of memory CD4+ cells Macrophages	Constitutive in many cell types, including CD4+ T cells and macrophages

Figura 12. Receptores para la entrada del VIH. Esté *et al.*, 2007.

El uso de un correceptor específico determina el tropismo celular del virus aunque, algunos VIH-1 pueden usar ambos, R5 y X4, entonces se dice que presentan un tropismo dual (D) (Figura 13). Desde hace 10 años, se han identificado numerosos cambios genéticos en CCR5, como polimorfismos que afectan a la probabilidad de infección por VIH, una delección del nucleótido 32 (CCR5 Δ 32) se ha visto que reduce el riesgo de adquirir la infección por VIH, e individuos homocigotos para CCR5 Δ 32, están protegidos de infección inicial por VIH tras numerosas exposiciones. El genotipo CCR5 es un determinante mayor para la infección por VIH, y se ha observado que la mayoría de las cadenas de VIH aisladas de pacientes poco después de la infección primaria son virus R5. (Kawamura *et al.*, 2005)

A pesar de que *in vitro* no hay muchas diferencias en la infección por virus con uno de los dos tropismos, *in vivo* parece que la transmisión de la infección se produce por VIH R5 trópicos casi exclusivamente, mientras que el VIH X4 trópico sólo emerge en las fases tardías de la enfermedad. Este hecho parece ser debido a la fuerte implicación de las células presentadoras de antígenos, en concreto células dendríticas, que producen CXCL12 bloqueando la posible infección por VIH X4 trópicos y seleccionando por tanto la infección por VIH R5 trópico. (Gonzalez *et al.*, 2010).

Una vez que se han unido CD4- VIH y el correceptor esta comprometido, se produce un cambio conformacional en gp120 que se vuelve mucho mas flexible, permitiendo la exposición de dominios estructurales (regiones V3) que interaccionan con los correceptores de quimiocinas. Esto permite que gp41 se reoriente paralelo al virus y a

la membrana celular y promueve los eventos que conducen a la fusión entre las dos membranas. A partir de ahora, el modelo presente para explicar la fusión asume un estado de transito intermedio en el cual gp41 espacia las dos membranas y forma una estructura compuesta de seis hélices (la región C-terminal se coloca sobre la N-terminal) antes de la fusión, que sirve para acercar las membranas y posicionarlas permitiendo la fusión, la internalización de la nucleocápside del virus y la desencapsidación de su genoma (Este & Telenti, 2007; Permanyer *et al.*, 2010; Tilton & Doms, 2010).

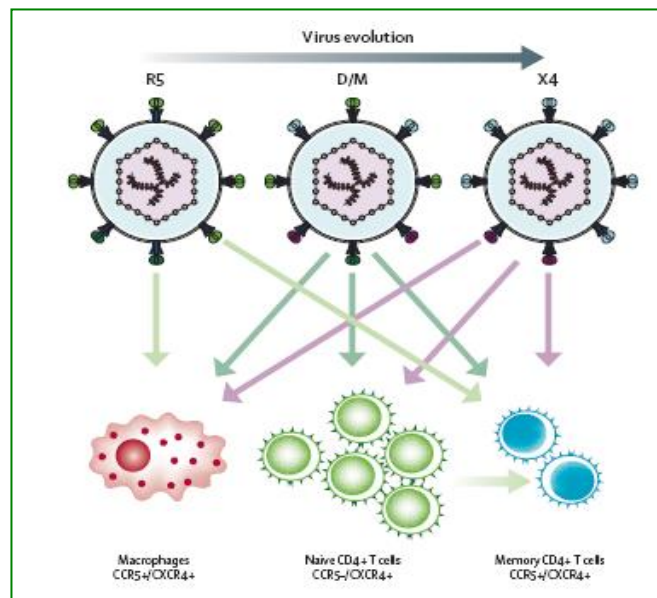


Figura 13. Tropismo celular. Las células T *naive* son CXCR4+ y CCR5- y raramente infectadas por virus R5. R5 VIH-1 son comúnmente transmitidas y persisten durante el curso de la infección pero pueden desarrollarse en poblaciones de virus de tropismo dual (D) o mezcla (M), y a X4 en estadios mas tardíos de la enfermedad. De los individuos *naive* tratados 12-19% tienen poblaciones D o M, y menos del 1% son infectados con virus X4. En individuos tratados, del 22.48% presentan poblaciones D o M, y 2-4% son infectados con X4. Esté *et al.*, 2007.

Han sido identificados receptores de lectina tipo C en macrófagos y células, dendríticas que a través de un mecanismo llamado trans-infección presentan el virus a los linfocitos T CD4 facilitando la infección (Lambert *et al.*, 2008 ; Permanyer *et al.*, 2010) La interacción VIH-célula dendrítica esta mediada por los glicanos de gp120 y la lectina tipo C DC-SIGN. DC-SIGN es tetramérica y es específicamente reconocida y N-conectada con oligosacáridos de manosa, a través de múltiples interacciones carbohidratos-proteína. (Martínez-Ávila *et al.*, 2009). Éste mecanismo incrementa la eficiencia de la infección, y previene la neutralización por anticuerpos o el sistema del complemento.

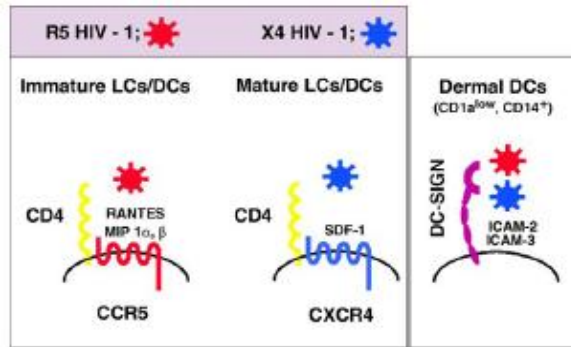
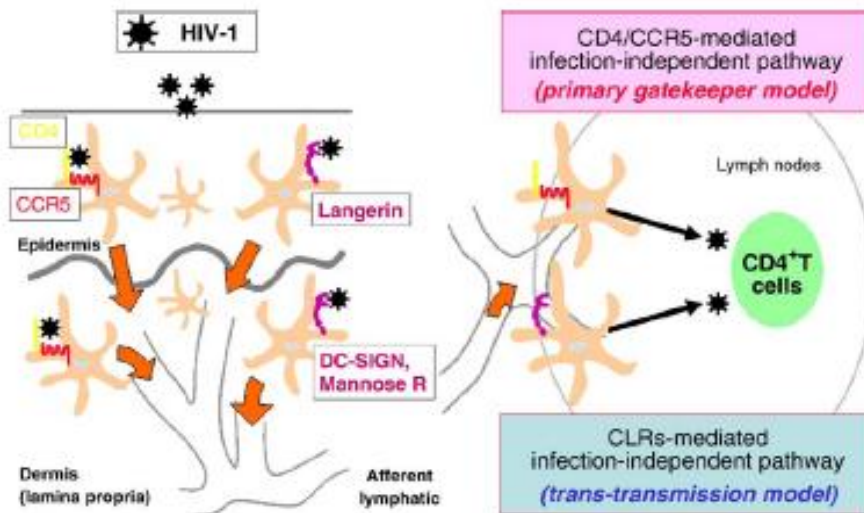


Figura 26. Receptores y correceptores expresados en la mucosa. Kawamura *et al.*, 2005

Figura 27. Eventos iniciales durante la transmisión sexual de VIH. Kawamura *et al.*, 2005



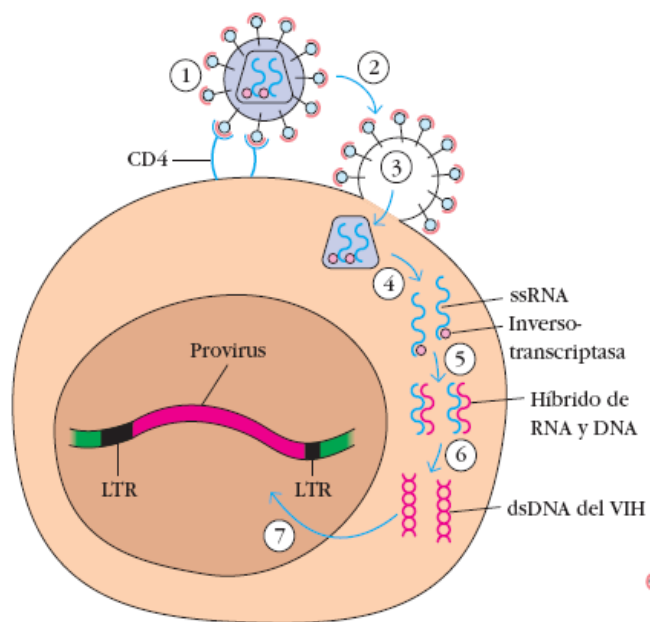
Actualmente, se está estudiando otra posibilidad de infección del VIH, por medio de endocitosis, evidencias recientes sugieren que la endocitosis entre células libres y células asociadas a partículas virales podría ser efectiva dando lugar a la introducción del virus y producir infección. Tales observaciones ponen de manifiesto la importancia de esta forma de entrada, como un mecanismo del sistema inmune para escapar del virus y de los inhibidores de la entrada (Permanyer *et al.*, 2010).

Tras la entrada, una vez en el citoplasma comienza la transcripción inversa o retrotranscripción (2) del ARN viral al ADN proviral, mediada por la TI del virión con actividad ARN polimerasa, y que conduce a la formación de la primera cadena del ADN a partir del ARN viral (ADN-). La perspectiva más aceptada hasta hace pocos años era que se producía la decapsidación, la retrotranscripción del ARN viral a ADN y su transporte al núcleo en los denominados complejos de preintegración. Sin embargo, algunos autores sugieren que el complejo de preintegración incluye la cápsida, en el interior de la que se produce la retrotranscripción protegida de las enzimas citoplasmáticas, y que sólo se pierde en las cercanías del núcleo. (Arhel *et al.*, 2007).

Parece ser que determinados factores celulares van a influir en este proceso; es el caso de TRIM5 α capaz de promover la ubiquitinación de la cápsida y por tanto su degradación, o la desaminasa de deoxocitidinas APOBEC3G, que promueve la aparición de mutaciones en este proceso, pero solo si se incorpora en la partícula viral antes de la infección de una nueva célula. Una vez completada la retrotranscripción, el complejo de preintegración, con o sin cápsida, formado por el ADN proviral, la IN viral, y algunos factores celulares como el coactivador LEDGF/p75, viaja al núcleo. Este coactivador se une a la IN y esta unión parece indispensable para una integración efectiva (Vandekerckhove *et al.*, 2006). La doble cadena así generada es integrada por medio de la IN viral en el ADN de la célula, aunque parte del ADN formado puede

Figura 16. Infección de la célula blanco. Inmunología de Kuby 2007

1. El gp120 del VIH se fija al CD4 sobre la célula blanco
2. El dominio fusógeno en gp41 y CXCR4, un receptor unido a proteína G en la membrana de la célula blanco, media la fusión
3. La nucleocápside que contiene el genoma vírico entra en la célula
4. El genoma vírico y los enzimas se descargan
5. La retrotranscriptasa vírica cataliza la transcripción inversa del ssRNA, con formación de híbridos de RNS y ADN
6. La ribonucleasa H, degrada parcialmente la plantilla original de RNA, que continúa con la síntesis de la segunda cadena de ADN para producir dsADN del VIH
7. El dsADN vírico se transpone en seguida al núcleo y se integra en el ADN cromosómico del hospedador por acción de la integrasa vírica



persistir en el citoplasma de la célula sin integrarse dentro del genoma celular, pero si presentando un reservorio de integración si la célula es activada. Esta integración, mediada por la integrasa viral, termina con la fase temprana del ciclo de replicación del VIH, con el provirus integrado en el genoma de la célula hospedadora. A pesar de que el VIH puede infectar linfocitos en reposo, en éstos la TI y la IN no parecen ser eficientes. Se suele producir un estadio de preintegración con ADN proviral fundamentalmente extracromosómico, o complejos ARN/ADN con transcripción inversa incompleta, que guardarían la capacidad de integrarse con posterioridad.

Una vez integrado en el material genético de la célula, el provirus puede permanecer latente o multiplicarse. En algunos tipos celulares infectados, como los linfocitos T CD4⁺ *resting*, el VIH es capaz de mantenerse integrado latente. En estado de latencia, al contrario de lo que la misma palabra sugiere, existe un cierto grado de transcripción,

pero no el suficiente como para lisar a la célula infectada. Si empieza a multiplicarse, lo puede hacer de una forma controlada o de una forma masiva, en cuyo caso ocasionará efectos citopáticos sobre la célula, mientras que en la latencia, producida tras la integración del provirus, no se producen alteraciones patológicas (fase tardía).

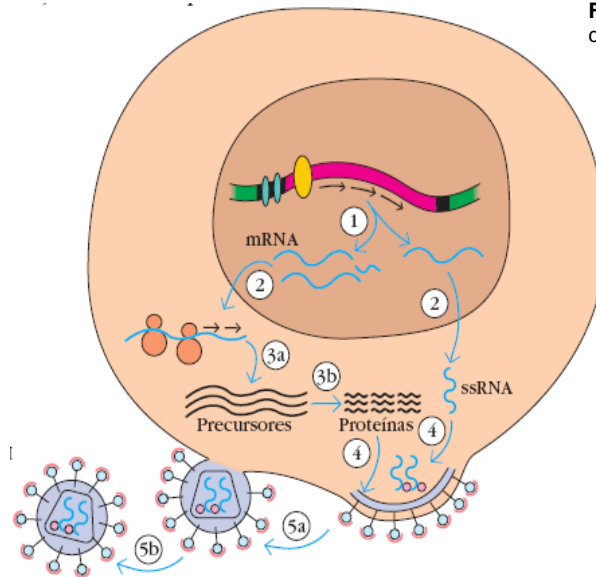


Figura 17. Activación del provirus. Inmunología de Kuby 2007

1. Los factores de transcripción estimulan la transcripción, de DNA provírico en ssRNA genómico y después del procesamiento de varios mRNA
2. El RNA vírico es exportado hacia el citoplasma
3. a) Los ribosomas de la célula hospedadora catalizan la síntesis de proteínas precursoras virales. b) La proteasa vírica segmenta los precursores en proteínas virales
4. El ssRNA y las proteínas virales se ensamblan por debajo de la membrana de la célula hospedadora, en la que se insertan gp41 y gp120
5. a) La membrana celular experimenta gemación y forma la cubierta vírica, b) Las partículas víricas descargadas completan su maduración; la proteasa presente en las partículas víricas escinde las proteínas precursoras

Una vez que la transcripción ha comenzado, los ARNs virales constituirán el material genético de los nuevos viriones o bien serán traducidos en los ribosomas a proteínas virales fundamentales para que el ciclo se complete. Entre estas proteínas encontramos la PR viral, también diana de los fármacos inhibidores de la PR, que corta y procesa las nuevas proteínas virales. También se traducen las proteínas de la envuelta viral, que maduran en el retículo endoplásmico y son transportadas a la membrana, aprovechándose del mecanismo de producción de proteínas de membrana celular. Otras proteínas virales, como las necesarias para la formación de la cápside (Gag), deben ser procesadas y transportadas a la membrana celular. Para que el correcto ensamblaje de todas las proteínas virales ocurra, es necesaria la presencia de factores tanto virales como celulares: la proteína viral *vpu*, capaz de internalizar el receptor CD4 evitando la reinfección y necesaria para la correcta liberación de las nuevas partículas virales ya que secuestra la proteína de membrana CD317 o teterina, capaz de “atar” los nuevos viriones a la membrana celular impidiendo su liberación (Neil *et al.*, 2008).

El ensamblaje del core ocurre en la membrana celular y parece comenzar con la asociación de la proteína p17 de la matriz con el dominio citoplasmático de la proteína gp41. La síntesis de las proteínas de la envoltura viral, se producen en el retículo endoplásmico de la célula huésped a partir de la gp160; ésta en el aparato de

Golgi se une a una PR para producir gp120 y gp41 antes de transportarlas a la superficie de la célula. El virión maduro está compuesto por una membrana, que incluye las proteínas virales gp120 y gp41, además de varias proteínas celulares

Patogenia

El VIH infecta linfocitos CD4+ y los destruye reduciendo su número y dando lugar a la pérdida de la inmunidad celular. Como consecuencia de ello, causa enfermedades como infección asintomática, enfermedad aguda con linfadenopatía, fiebre, sudoración, mialgias, exantema, vómitos y diarrea y SIDA. En este último caso, se produce una disminución espectacular de linfocitos CD4 que dan lugar a inmunodeficiencia, infecciones oportunistas (por ejemplo neumonía por *Pneumocystis jirovecii*), pérdida de peso, alteraciones en el sistema nervioso central y muerte. En el periodo 2004-2008, la tuberculosis siguió siendo la enfermedad indicativa de SIDA más frecuente, afectando al 28,8% de los casos. Le sigue la neumonía (22,9%), y la candidiasis esofágica (14%) (Figura 18).

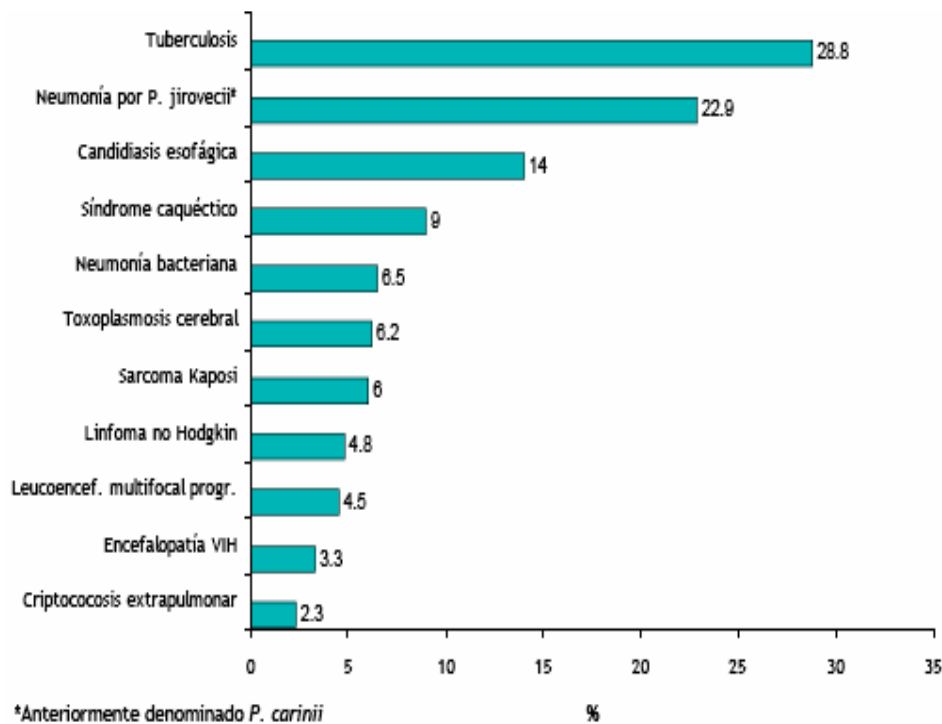


Figura 18. Enfermedades diagnósticas de SIDA mas frecuentes en España en el periodo 2004-2009. (Sistemas Autonómicos de Vigilancia Epidemiológica, 2011).

2. LA RESPUESTA INMUNITARIA

Una de las funciones del sistema inmune es proteger el cuerpo de la colonización de invasores virales y microbianos. Cualquier agente que sea reconocido por el sistema inmune como extraño, o como una amenaza para el cuerpo, puede desencadenar una respuesta inmune. Existen dos tipos de respuesta inmunitaria, denominados *respuesta innata* y *respuesta adaptativa*.

La respuesta inmune *innata* es la principal vía de eliminación de aquellos microorganismos que superan la barrera de los epitelios. Esta mediada por células sanguíneas como macrófagos y neutrófilos, que se encargan de fagocitar y eliminar a los patógenos, y al mismo tiempo sintetizan mediadores y citocinas. Los macrófagos degradan los agentes infecciosos, y los componentes del patógeno son presentados a los linfocitos T, dando lugar a la activación de la respuesta *inmune adaptativa*. Esta se caracteriza por la especificidad que presenta ante agentes extraños, debido a la existencia de un gran repertorio de receptores presentes en los linfocitos T y B, capaces de reconocer estructuras propias y ajenas (Kindt *et al.*, 2007).

Estas barreras que revisten todas las superficies externas del organismo, presentan defensas mecánicas y bioquímicas, que ayudan a evitar la entrada de un patógeno en el organismo. La diferencia entre inmunidad innata e inmunidad adquirida o adaptativa se refleja en la figura 34

Por tanto *la inmunidad innata* es:

- Inespecífica
- Respuesta primera y más rápida

En ella intervienen:

- Defensas externas: lisozimas, piel
- Neutrófilos, macrófagos,...
- Citocinas, sistema de complemento y proteínas de fase aguda

	Innata	Adaptativa
Tiempo de respuesta	Horas	Días
Especificidad	Limitada y fija	Muy diversa; mejora durante el curso de la reacción inmunitaria
Respuesta a infecciones repetidas	Idéntica a la respuesta primaria	Mucho más rápida que la respuesta primaria
Componentes principales	Barreras (p. ej., piel); fagocitos; moléculas de reconocimiento de patrón	Linfocitos; receptores específicos de antígeno; anticuerpos

Figura 19. Comparación de las inmunidades innata y adaptativa. Adaptado de Inmunología de Kuby 2007

Sintetizando, la respuesta *inmune adaptativa* (o inmunidad específica) se activa si microorganismos infecciosos u otros antígenos extraños persisten y la respuesta inmunológica se dirige únicamente contra los antígenos específicos del invasor. El sistema también mantiene una memoria inmunológica de la infección o exposición previa a ese agente, de tal modo, que en las exposiciones subsecuentes, el organismo pueda preparar una respuesta mucho más rápida y potente contra ese antígeno.

Las células inmunológicas involucradas en este sistema, son los linfocitos T y B. Las células B son las encargadas de producir anticuerpos antígeno-específicos. Las células T se dividen en dos grupos:

- Las células T colaboradoras (Th) que ayudan a reclutar otras células inmunitarias para participar de forma conjunta en la respuesta
- Las células T citotóxicas (Tc) que destruyen las células infectadas y dañadas

La memoria inmunológica se basa en el proceso de selección y expansión clonal. Después de la exposición a un antígeno o patógeno, algunos linfocitos T y B se almacenan como células de memoria. Cuando ese antígeno o patógeno se encuentra de nuevo, estas células preparadas organizan una repuesta más rápida y más intensa contra ese antígeno específico. Esta respuesta erradica al patógeno antes que se disemine en el organismo. Este principio sirve de base para la práctica de la vacunación.

2.1. LA INFLAMACIÓN

La inflamación juega un papel importante como primera respuesta inmune del cuerpo (respuesta innata). Su función es destruir, diluir o bloquear un agente nocivo (microbios, toxinas) y poner en marcha una serie de eventos que curan y reparan el tejido lesionado. Este complejo proceso, que conlleva la acción de un gran número de componentes, puede ser originado por factores endógenos (necrosis tisular, o rotura ósea), factores exógenos como lesiones por agentes mecánicos (cortes, golpes, etc), físicos (quemaduras), químicos (corrosivos), biológicos (microorganismos) e inmunológicos (reacciones de hipersensibilidad). Generalmente, supone una respuesta protectora para el organismo, aunque en algunos casos como la hipersensibilidad y las enfermedades autoinmunes, la inflamación puede tener consecuencias nocivas.

La inflamación se puede dividir en aguda y crónica según su duración. La inflamación aguda es de corta duración (horas o pocos días). Se caracteriza por un aumento del flujo sanguíneo debido a la vasodilatación y aumento de la permeabilidad capilar. Esto permite el exudado de fluidos plasmáticos y la migración de las células inflamatorias al foco de inflamación, y en algunos casos, activación de la cascada de la coagulación. Sin embargo, la inflamación crónica tiene una duración mayor (semanas, meses e incluso años), y se caracteriza por el infiltrado de leucocitos y macrófagos, con proliferación de vasos sanguíneos y de tejido conectivo.

Durante el proceso inflamatorio, se producen una serie de eventos en los que están involucrados los factores solubles o mediadores de la inflamación, los cambios en la permeabilidad vascular y la migración de los leucocitos (Esplugues & Barrachina 2009). La liberación de los mediadores en el foco inflamatorio y su acción sobre las distintas células, así como, los cambios que se producen en el flujo sanguíneo,

caracteriza a los cuatro signos ya descritos por Cornelius Celsius en el siglo I a de C: *rubor, tumor, calor y dolor*; estos signos fueron completados posteriormente por Galeno con *la pérdida de función del órgano afecto*.

Estos signos son consecuencia de:

1) Vasodilatación local, con exceso de flujo sanguíneo local consecuente.

2) Aumento de la permeabilidad de los capilares, con fuga de grandes cantidades de líquido hacia los espacios intersticiales; también pueden escapar de los capilares, moléculas más grandes de lo habitual, lo que facilita el transporte de mediadores solubles de la inmunidad hasta el lugar.

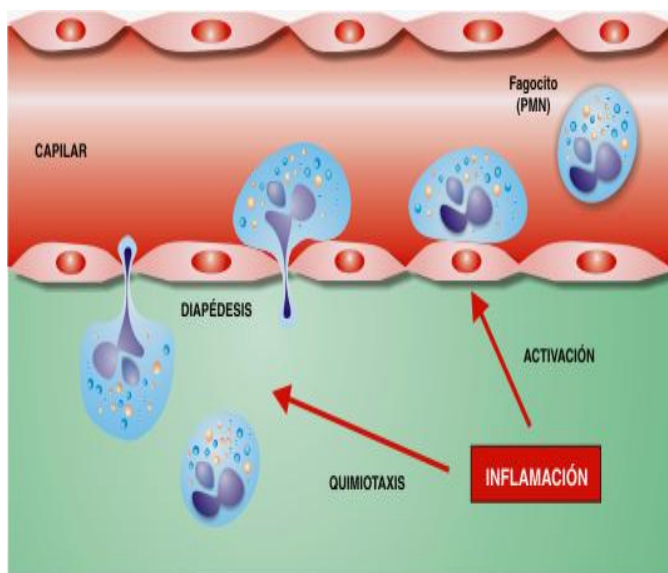


Figura20. Proceso inflamatorio. Regueiro et al., 2008

3) Con frecuencia, coagulación de líquido en estos espacios a causa de las cantidades excesivas de fibrinógeno y otras proteínas que salen de los capilares.

4) Migración de gran número de granulocitos y monocitos hacia el tejido

5) Tumefacción celular. Algunos de los muchos productos tisulares que producen estas reacciones son: *histamina, bradicinina, serotonina, prostaglandinas, diversos productos de reacción del sistema complemento, productos de reacción del sistema de coagulación de la sangre y muchas sustancias hormonales llamadas linfocinas*, liberadas por los linfocitos T sensibilizados, que son componentes del sistema inmunitario.

Varias de estas sustancias activan energicamente el sistema de los macrófagos, que en el plazo de unas cuantas horas empiezan a devorar los tejidos destruidos; a veces, sin embargo, los macrófagos también lesionan aún más a las células tisulares que siguen vivas.

Desafortunadamente, existen situaciones en las que la respuesta inflamatoria no resulta beneficiosa. Por ejemplo, el caso de una enfermedad como la artritis reumatoide (AR), en la que la respuesta inflamatoria es desproporcionada frente a la amenaza a la que se enfrenta. Aún no se conoce bien cual es la causa de la AR pero se sabe que es una enfermedad autoinmune. El sistema inmune del cuerpo ataca el tejido articular sano y ocasiona inflamación y daño en las articulaciones.

Esta comprobado que uno de los primeros resultados de la inflamación es “tabicar” la zona lesionada, separándola del resto de los tejidos. Los espacios tisulares y los linfáticos de la zona inflamada, quedan bloqueados por coágulos de fibrinógeno, de manera que el líquido apenas fluye a su través. Esto retrasa la difusión de bacterias o productos tóxicos.

Otro de los fenómenos característico de la inflamación es la migración leucocitaria, proceso que se desarrolla en varias etapas: quimiotaxis, adhesión y diapedesis. Habitualmente, situados en la parte central del torrente circulatorio, los linfocitos no tienen contacto con las células endoteliales. Sin embargo, durante el proceso inflamatorio, al aumentar la permeabilidad vascular, el flujo sanguíneo se enlentece permitiendo el acercamiento de los leucocitos al endotelio. En la fase inicial, los leucocitos entran en contacto las células endoteliales, y ruedan por el endotelio de las venas contiguas al foco inflamatorio, atraídos por factores quimiotácticos. Estos factores pueden ser productos bacterianos, factores liberados por las células necróticas, o quimiocinas que se forman en el foco inflamatorio y responsables de la activación leucocitaria. Cuando las células del endotelio se activan, cambian su morfología y presentan moléculas de adhesión en su superficie tales como selectina P y E, que utilizan para unirse a los leucocitos y activarlos, provocando la expresión de otras moléculas de adhesión llamadas integrinas en los leucocitos. Tras la adhesión, los leucocitos atraviesan el endotelio mediante diapedesis.

2.2 Respuesta de los macrófagos y neutrófilos a la inflamación

2.2.1 Los macrófagos tisulares como primera línea de defensa. Los macrófagos que se encuentran en los tejidos, sean histiocitos en el tejido subcutáneo, macrófagos alveolares en los pulmones, microglía en el cerebro, etc., comienzan inmediatamente su acción fagocitaria cuando son activados por los productos de la inflamación. El primer efecto consiste en aumentar su tamaño y se convierten en unidades móviles formando la primera línea de defensa.

2.2.2. Neutrofilia e invasión por neutrófilos del área inflamada. Segunda línea de defensa. Tras la primera hora más o menos del comienzo de la inflamación, un número considerable de neutrófilos comienza a invadir las áreas inflamadas. Ello se debe a los productos procedentes de tejidos inflamados, que dañan la superficie interna del endotelio capilar, haciendo que los neutrófilos se adhieran en las paredes capilares del área inflamada en un proceso llamado “marginación”. Además, aumenta la permeabilidad de los capilares y pequeñas vénulas, y ello permite que los neutrófilos pasen por diapedesis hacia los espacios tisulares. La quimiotaxis hace que los neutrófilos migren a los tejidos lesionados. Por tanto, varias horas después, la zona

cuenta con un gran número de neutrófilos que se suma al aumento de neutrófilos en sangre o “*neutrofilia*”, que también pasan a la zona inflamada. Es el resultado de una combinación de sustancias químicas que se liberan desde los tejidos inflamados, difunden hacia la sangre y alcanzan la médula ósea, donde movilizan gran número de leucocitos, principalmente neutrófilos formados previamente, y almacenados en el tejido medular (Flórez *et al.*, 2008).

2.2.3. Invasión por monocitos y macrófagos del tejido inflamado. Tercera línea de defensa. También, los monocitos pasan desde la sangre a la zona inflamada; no obstante, su número es bajo, y su acumulación y desarrollo (contenido y volumen de lisosomas) en el tejido inflamado es mucho mas lento que en el caso de los neutrófilos, requiriendo varios días para que se haga efectiva. Sin embargo, al cabo de días o semanas, los macrófagos predominan sobre las demás células fagocíticas del área inflamada, gracias a la producción de monocitos por la médula ósea. Los macrófagos pueden fagocitar muchas más bacterias y grandes partículas, incluso polimorfonucleares y grandes cantidades de tejido necrótico.

Los macrófagos una vez activados, actúan como células secretoras de factores quimiotácticos, mediadores proinflamatorios y citotóxicos como son las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno entre los que se encuentran el óxido nítrico, el peróxido de hidrógeno o el anión superóxido (O_2^-). Además, liberan enzimas hidrolíticas, mediadores lipídicos y citocinas como el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α , del inglés “*Tumour Necrosis Factor- α* ”), las interleucinas (ILs) IL-1, IL-6 y el IFN- γ , que participan en la destrucción del antígeno y, promueven la respuesta inflamatoria al estimular el crecimiento de células fagocíticas y la activación de los linfocitos T. (Kopf *et al.*, 2010). El TNF- α y la IL-1 parecen mediar la acción del resto.

Los macrófagos también desempeñan una acción fundamental como células presentadoras de antígenos, ya que se encargan de destruir patógenos y de procesar y presentar los antígenos a los linfocitos T, desencadenando el inicio de la respuesta inmune adaptativa y la producción de anticuerpos. Todas estas acciones se resumen en la figura 21. Como podemos ver, el macrófago una vez activado libera mediadores proinflamatorios y citotóxicos, enzimas lisosómicos, y citocinas. Además, actúa procesando y presentando antígenos a los linfocitos T, y debido a su capacidad fagocítica y a su participación en la reparación de tejidos, desempeña un papel importante en la resolución de la inflamación.

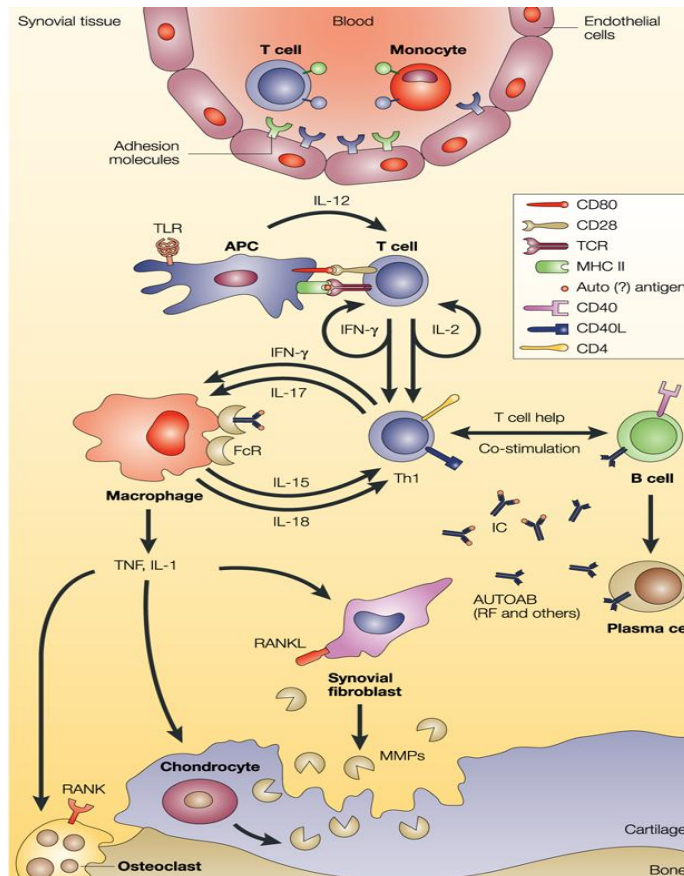


Figura 21. Esquema de proceso desencadenado en una articulación inflamada

2.3. Mediadores de la inflamación

Existen fundamentalmente tres tipos de mediadores implicados en el desarrollo de los procesos inflamatorios: mediadores polipeptídicos o citocinas, ROS y RNS (NO, H₂O₂, O₂⁻, ácido hipocloroso) y mediadores lipídicos bioactivos derivados de los fosfolípidos de membrana.

2.3.1. Citocinas

Las citocinas son un grupo de proteínas de bajo peso molecular,. Las células que mayor cantidad de citocinas producen son los macrófagos (inmunidad innata) y los linfocitos T (Inmunidad adaptativa). Estas proteínas desempeñan un papel importante en los procesos inmunes e inflamatorios, participando en la presentación de antígenos, diferenciación y maduración de células del sistema inmune, y en la expresión de moléculas de adhesión.

La rápida liberación de citocinas conforma la naturaleza de la respuesta inflamatoria, y esa respuesta puede ser beneficiosa (como producir la protección inmunitaria), o perjudicial (como la inducción de la inmunopatología). En lo alto de la cascada de citocinas inflamatorias, se encuentran moléculas tales como el TNF- α , factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF, del inglés “*Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*”), IL-1, IL-6, IL-12 e IL-23. Ellas son secretadas mayoritariamente por células mieloides, y todas ellas tienen efectos fundamentales en múltiples componentes del sistema inmune (Figura 22).

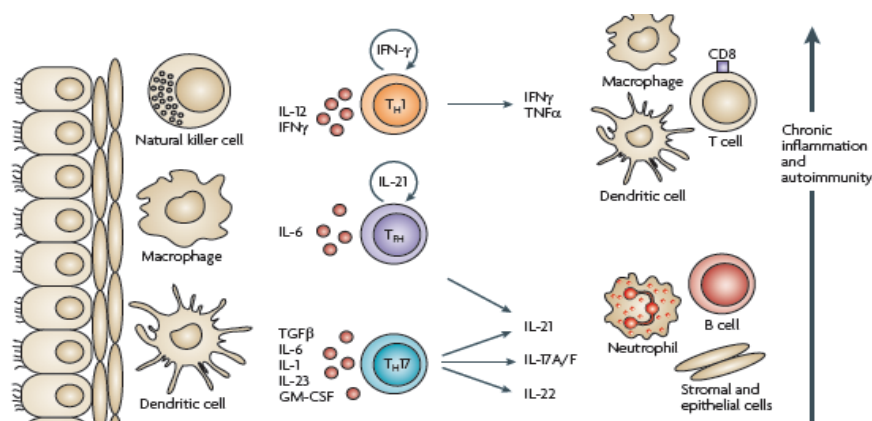


Figura 22. Proinflamación y citocinas efectoras involucradas en enfermedades autoinmunes, inflamatorias y enfermedades alérgicas Kopf *et al.*, 2010

Las citocinas, se agrupan en dos familias, citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias.

2.3.2.Citocinas proinflamatorias: favorecen la inflamación al activar la expresión de genes que codifican enzimas del proceso inflamatorio como la ciclooxygenasa-2 (COX-2), la oxido nítrico sintetasa (NOS, del inglés “*Nitric Oxide Synthetase*”) y la fosfolipasa A2 (FLA2), y liberan mediadores inflamatorios como las prostaglandinas (PGs), leucotrienos (LTs), NO o factor activador de plaquetas (PAF, del inglés “*Platelet Activating Factor*”). Entre ellas destacan la IL-1 y el TNF- α , producidos principalmente por macrófagos, aunque el TNF- α también por linfocitos T.

2.3.2.1.Factor de necrosis tumoral- α

El TNF estaba formado por dos productos diferentes, el TNF- α que era idéntico a una endotoxina que se produce en algunas enfermedades como la coagulación intravascular diseminada, y el TNF- β idéntico a la linfotoxina humana.(Kopf *et al.*, 2010).

Ambas formas del TNF tienen funciones similares. El TNF- α es producido sobre todo por los macrófagos y ejerce sus efectos sobre las células tumorales e inflamatorias. El TNF- β es excretado por algunas células T, en particular por las células T citotóxicas y las células colaboradoras (Helpers), y también ataca células tumorales en las que induce efectos citotóxicos.

El TNF- α pertenece a la familia de las citocinas que estimulan las reacciones agudas. El TNF- α se presenta en forma de trímeros que pueden estar unidos a membranas celulares (se habla entonces de mem-TNF- α) o en solución (s-TNF- α).

El TNF- α es producido por numerosas células, influyen los monocitos, fibroblastos y células epiteliales. Otras células que lo producen al ser estimuladas, son los macrófagos, células T y linfocitos V, granulocitos, células musculares lisas y

queratinocitos. Las células del glioblastoma producen grandes cantidades de TNF- α (Campbell *et al.*, 2003).

Los virus, parásitos, endotoxinas bacterianas, células tumorales, isquemia, trauma e irradiación son estímulos patológicos que favorecen o aumentan la secreción de TNF- α . El efecto pleitrópico del TNF- α tiene como resultado la síntesis de citocinas como las IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, IFN- γ , factor de crecimiento y transformación- β (TGF- β , del inglés, "*Transforming Growth Factor- β* "), PAF, LTs, proteínas de fase aguda y hormonas (cortisol, epinefrina, glucagón, insulina, norepinefrina). Muchos de los mediadores inducidos por el TNF- α actúan a su vez como inhibidores de su expresión, tales como la IL-6, IL-10, la PGE₂ y el cortisol. En los fibroblastos, la producción del TNF- α es inducida por el factor de crecimiento neuronal, y en las células endoteliales, epiteliales y fibroblásticas por la IL-17 (Campbell *et al.*, 2003).

Se conocen dos receptores para el TNF- α , denominados TNF-R1 ó CD120a, y TNF-R2 ó CD129b.

El factor nuclear NF- κ B, es un factor de transcripción dimérico que activa la expresión de muchos genes implicados en condiciones patológicas. La activación inapropiada de NF- κ B en enfermedades tales como artritis reumatoide, y de respuesta inflamatoria sistémica ha sido atribuido a TNF- α y otros miembros de su superfamilia.

Los dos receptores pueden activar las vías de transducción de señales del NF- κ B o de las cinasas activadas por proteínas mitogénicas. Estas opciones de múltiples señales, permiten al TNF- α promover una gran variedad de respuestas celulares, como la apoptosis en la proliferación celular, o la movilización de los leucocitos. Los receptores para el TNF- α se encuentran en las células mononucleares, la membrana sinovial, la sangre periférica y el líquido sinovial. También existen receptores libres en solución que han sido excretados por las células mononucleares.

Existen evidencias que sugieren que el TNF- α contribuye a la patología de diversas enfermedades como artritis, psoriasis, espondilitis anquilosante etc.

En vista de la función del TNF- α en relación al desarrollo de enfermedades inflamatorias, los tratamientos anti-TNF- α han surgido como una de las principales opciones terapéuticas en este campo., diversas proteínas inhibitorias de TNF- α han sido aprobadas para uso clínico en varias enfermedades inflamatorias.

Existen numerosas aplicaciones clínicas que tienen como objetivo las citocinas, como en enfermedades inflamatorias, inmunoterapia en cáncer, desórdenes del hueso, enfermedades metabólicas, y en terapia antiviral. (Kopf *et al.*, 2010). En algunas enfermedades como la AR, el lupus eritematoso sistémico, la esclerosis múltiple y en algunas formas de osteoartritis, los receptores al TNF- α solubles son más abundantes

de lo normal. Este mayor número de receptores "captura" un cierto número de moléculas de TNF- α , quedando menos de estas para activar las células mononucleares. En cierto modo, los receptores solubles al TNF- α actúan como inhibidores naturales. Existe una relación entre los niveles de receptores solubles y la intensidad de la enfermedad. (Campbell *et al.*, 2003).

Estos hallazgos han llevado al desarrollo de fármacos que antagonizan o inhiben el TNF- α . Todos estos fármacos han mostrado su utilidad en el tratamiento de la AR, la enfermedad de Crohn, la artritis psoriásica, psoriasis en placa y otras enfermedades caracterizadas por una mayor expresión del TNF- α .

2.3.3. Citocinas antiinflamatorias: Actúan bloqueando la inflamación, al inhibir la expresión de genes inflamatorios o impedir la acción de las citocinas proinflamatorias. Entre las principales citocinas antiinflamatorias destacan la IL-1ra (receptor antagonista de IL-1, IL-4, IL-6, IL-10, IL-11, IL-13 y TGF- β). Son liberados principalmente por macrófagos, linfocitos T y linfocitos B. Las citocinas IL-4, IL-10, IL-11 e IL-13 destacan por su función como inhibidores de la síntesis de las citocinas proinflamatorias IL-1, TNF- α , IL-2 e INF- γ y de quimiocinas. La IL-11 disminuye la síntesis de IL-1 y TNF- α a través de la inhibición de $\text{NF-}\kappa\text{B}$ en macrófagos, y de IL-2 e INF- γ en linfocitos T. La IL-6, cuando actúa como citocina antiinflamatoria, disminuye la liberación de IL-1, TNF- α e INF- γ , y potencia la síntesis de citocinas antiinflamatorias, IL-1ra, IL-10 y TGF- β .

2.3.4. Óxido nítrico

El NO es una molécula pequeña (30 Da), de naturaleza gaseosa, que se sintetiza en la mayoría de las células del organismo a partir de la L-arginina. Participa en la regulación del tono vascular, actúa como neurotransmisor en el sistema nervioso central y periférico, y media la citotoxicidad del macrófago en la defensa inmunitaria inespecífica.

Se puede decir que prácticamente todas las células estudiadas hasta la fecha son capaces de sintetizar NO mediante una de las tres isoformas de la enzima NOS.

La NOS endotelial y la NOS neuronal, se expresan preferentemente de forma constitutiva y sintetizan pequeñas cantidades de NO de forma continua;

La eNOS se localiza sobre todo en las células endoteliales, plaquetas y células mesangiales renales, y está implicada en la regulación de la homeostasia vascular, mientras que la nNOS se encuentra mayoritariamente en neuronas del sistema nervioso central y periférico, y produce un NO que actúa como neurotransmisor. Muchas células (macrófagos, hepatocitos, neutrófilos, fibra lisa vascular, células

endoteliales, etc.) genera , un volumen importante de NO que actúa como citotóxico. tras entrar en contacto con endotoxinas o determinadas citocinas,

La activación de nNOS y eNOS es inducida por Ca^{2+} y calmodulina dando lugar a la síntesis de pequeñas concentraciones de NO que actúa como mensajero en el sistema nervioso central, inhibe la adhesión y agregación plaquetaria e induce vasodilatación. La iNOS por el contrario, es insensible a la Ca^{2+} /calmodulina, se regula a nivel transcripcional e induce la liberación prolongada de grandes cantidades de NO. Se expresa entre otras células, en macrófagos, fibroblastos, células endoteliales y células del músculo liso, en respuesta a la estimulación de citocinas como IL-1, IFN- γ , TNF- α y productos bacterianos como el lipopolisacárido (LPS). Debe existir un balance de citocinas para regular la expresión de esta enzima, ya que por ejemplo su expresión es inhibida por IL- 4 e IL-10 en los macrófagos. La expresión de la iNOS esta incrementada en patologías como la AR, malaria y hepatitis C (Sharara *et al.*, 1997; Clark *et al.*, 2003).

Los electrones desapareados de la molécula de NO son cedidos al oxígeno (O_2), dando lugar a nitrato (NO_3^-) y nitrito (NO_2^-) e inactivando la molécula. Con el anión superóxido (O_2^-), forma el radical peroxinitrito (ONOO^-), un poderoso agente oxidante con actividad citotóxica que se ha relacionado con la respuesta inmunitaria inespecífica. Por último, el NO puede interaccionar de forma irreversible con grupos tiol o metales como el hierro en proteínas, pudiendo formar complejos que activen o inactiven las células diana. La combinación del NO con superóxidos produce radicales como el peroxinitrilo, dióxido de nitrógeno o hidroxilos, que tienen la capacidad de lesionar las células diana.

El NO está implicado en la respuesta inflamatoria al intervenir en el control de la infección, regulando la cascada de señalización de factores de transcripción como el NF- $\kappa\beta$, mediante la nitrosilación de las subunidades p50 y p65, la respuesta vascular, la migración de los leucocitos, la producción de citocinas y la proliferación y apoptosis de las células inflamatorias. Concentraciones elevadas de este mediador, sintetizadas en macrófagos activados a través de la iNOS, constituyen uno de los principales mecanismos citotóxicos y proapoptóticos que participan en la respuesta inmune de mamíferos. Éstos efectos afectan a algunos tipos de células como son las células inflamatorias, exceptuando los macrófagos que al ser activados son resistentes a la apoptosis.

3. AGENTES ANTIVIRALES

3.1. Introducción

Resulta difícil encontrar fármacos cuya actividad sea selectiva para cada virus. Los compuestos antivirales, para ser eficaces e inocuos, deben poseer la facultad de distinguir claramente entre las funciones celulares y las virales, ya que los virus replican intracelularmente y con frecuencia utilizan enzimas, macromoléculas y orgánulos de la célula huésped para sintetizar las partículas virales. Por tanto, el empleo clínico de los agentes antivirales debe acompañarse de una estrecha vigilancia sobre posibles efectos colaterales o tóxicos no previstos.

Por otra parte la presencia o ausencia de inmunidad preexistente y la capacidad para desarrollar respuestas inmunitarias humorales o celulares o de ambos tipos, son factores muy importantes que influyen en el pronóstico de las infecciones virales.

El empleo de los compuestos antivirales requiere un diagnóstico específico y a tiempo ya que muchas veces, cuando la infección comienza a mostrar manifestaciones clínicas, el proceso de replicación viral esta ya muy avanzado, dificultando así la intervención del fármaco con éxito. Por todo ello, la terapéutica antiviral se ha convertido a lo largo de la última década en uno de los temas de mayor interés científico y sanitario mundial, incrementándose la necesidad de búsqueda de nuevos agentes antivirales.

3.2. Agentes antivirales utilizados en terapéutica

Al presentar estos agentes, mecanismos de acción y estructuras químicas muy diversas, se hace complejo poder llegar a una clasificación idónea de los mismos. En base a su aplicación en la práctica clínica podemos hablar de:

- Antiherpéticos
- Antigripales
- Antiretrovirales
- Antivirales de amplio espectro.

3.2.1. Agentes antiherpéticos

Teóricamente, el ciclo de vida del VHS ofrece muchas posibilidades de desarrollar estrategias antivirales. Actualmente, la única diana de actuación se sitúa en la replicación del ADN, con los análogos de nucleósidos tales como *aciclovir*, que reducen la carga viral. Ello puede contribuir a disminuir la severidad física de las

lesiones y el número de células infectadas por el organismo, incluso reduce la posibilidad de transmisión a otros individuos. Sin embargo, la terapia prolongada con éstos fármacos da lugar a la aparición de virus resistentes a los mismos por mutaciones en los genes de la timidina cinasa y/o polimerasa, y la aparición de efectos secundarios indeseables como neurotoxicidad de *aciclovir* y *ganciclovir*, y fallo renal agudo de *foscarnet*. Por ello, uno de los focos de atención para el desarrollo de nuevas terapias va encaminado a la actuación conjunta de fármacos antivirales con diferentes mecanismos de acción, que ejerzan efectos sinérgicos, especialmente en resistencias en pacientes inmunocomprometidos. (Wang et al 2010) Los fármacos disponibles en la actualidad para el tratamiento de infecciones herpéticas son:

-Análogos de guanosina: *aciclovir*, *ganciclovir*, *valaciclovir*, *famciclovir*, *penciclovir*

Éstos fármacos son derivados acíclicos de la base púrica, y al trifosforilarse son activos.

La primera molécula de fosfato la introduce la timidina quinasa que es una enzima vírica; esto hace que solo actúen en células infectadas, donde existe replicación vírica.

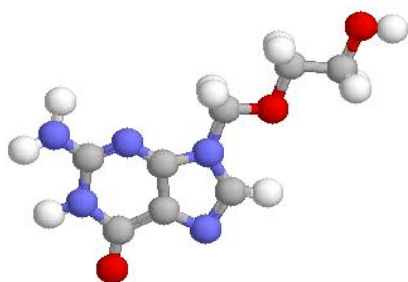


Figura 24. Aciclovir.
www.pharmainformatic.com

Después de la fosforilación, el efecto antiviral continúa por dos vías:

- Inhibiendo de manera selectiva la ADN polimerasa vírica
- Incorporándose como componente a la cadena de ADN vírico, impidiendo con ello su elongación ya que carecen del grupo hidroxilo en 3' del azúcar

-Otros análogos de nucleósidos

Idoxuridina y *trifluridina*: inhiben la síntesis del ADN vírico, al incorporarse al ADN vírico y al celular. Se administran por vía tópica, debido a su elevada toxicidad por vía sistémica. Aparecen efectos adversos como irritación, edema, eritema, picor.

Vidarabina: con similar eficacia clínica que *aciclovir*, se utiliza en casos de resistencia a este fármaco por déficit o alteración de timidina cinasa. Se piensa que su mecanismo de acción guarda relación con la inhibición de la síntesis de ADN vírico. Sin embargo, su uso está restringido al ser un fármaco oncogénico, teratógeno y mutagénico; también presenta toxicidad gastrointestinal.

Foscarnet: es el único fármaco de este grupo no análogo de nucleósidos. Es un análogo de pirofosfato inorgánico, e inhibe irreversiblemente la ADN polimerasa del virus del herpes, y también la TI del VIH. Presenta toxicidad sobre todo a nivel renal. Es tratamiento de elección, junto a *ganciclovir*, en infecciones por CMV.

3.2.2 Agentes antigripales

3.2.2.1 Inhibidores de la proteína viral M2 (matriz viral)

La *amantadina* y *rimantadina* (un análogo estructural del primero no comercializado en España) bloquean una fase precoz de la replicación viral, al impedir la descapsidación una vez que el virus ha penetrado en la célula. Pueden aparecer cepas resistentes a los pocos días de empezar el tratamiento. Aparecen efectos adversos en enfermos con insuficiencia renal, convulsiones, coma e incluso muerte.

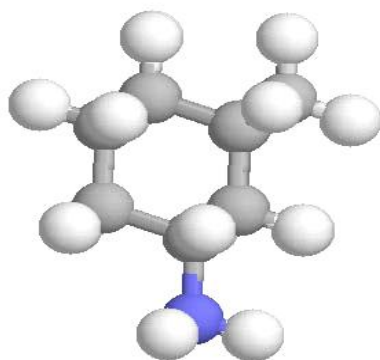


Figura 25. Amantadina.
www.pharmainformatic.com

Éstos fármacos a dosis bajas son potentes inhibidores de la infecciones por virus influenza únicamente del tipo A; no interfieren con la vacuna, por lo que pueden usarse conjuntamente, y a mayores concentraciones inhiben el virus influenza B, parainfluenza y de la rubeola.

6.4.2.2 Inhibidores de la neuraminidasa: Zanamivir y Oseltamivir

Estructuralmente son análogos del *ácido siálico*. Actúan inhibiendo la neuraminidasa viral de los virus influenza tipo A y B. Se administran vía inhalatoria (*zanamivir*) o vía oral (*oseltamivir*), y administrados precozmente (antes de las 48 horas) se ha visto que disminuyen la duración y los síntomas de la gripe.

3.2.3 Agentes antirretrovirales

Se utilizan para el tratamiento del SIDA. Éstos fármacos, que podemos ver representados en la Figura 26, se clasifican en función de la fase del ciclo de replicación en la que intervienen. Así, se dispone de:

- Inhibidores de la entrada viral
- Inhibidores de la integrasa
- Inhibidores de la retrotranscriptasa
- Inhibidores de la proteasa
- Inhibidores de la maduración

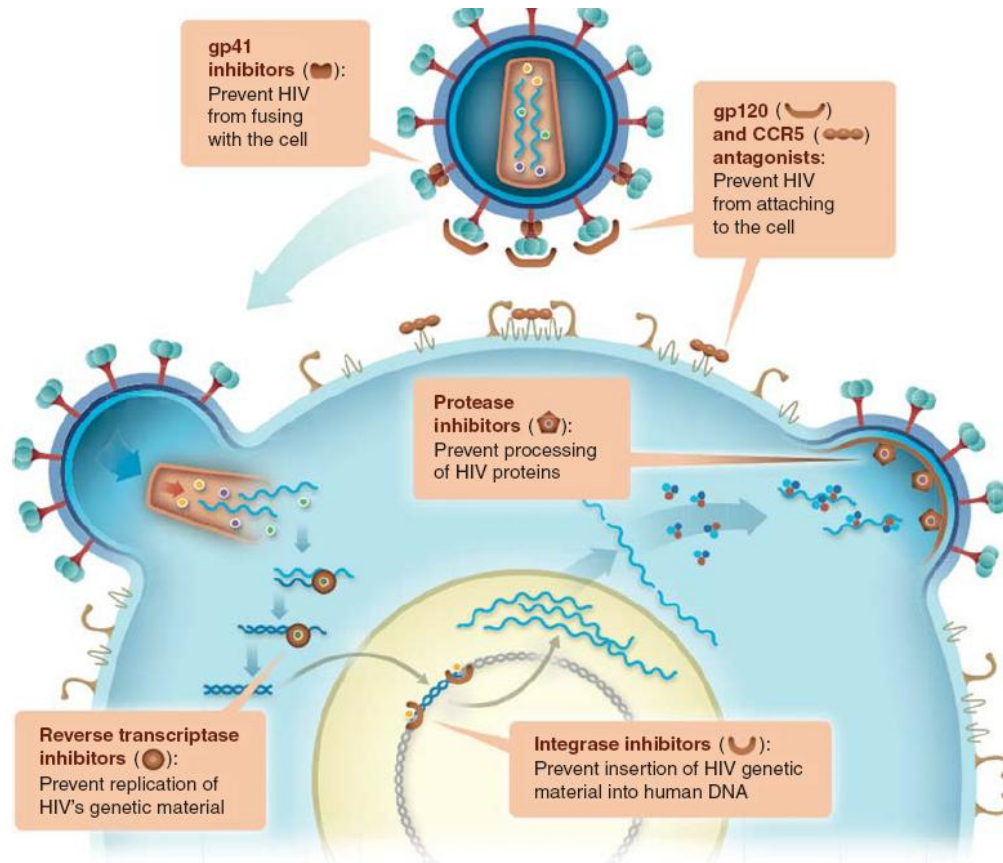


Figura 26. Esquema de actuación de los agentes antirretrovirales según las fases del ciclo biológico del VIH.

Shattock *et al.*, 2012.

3.2.3.1. Inhibidores de la entrada

El ciclo vital del VIH comienza cuando una proteína del virus gp-120 se une al receptor CD4 en la célula. Esto induce un cambio conformacional en gp-120 facilitando su unión al correceptor CCR5 y CXCR4, y dando lugar a la fusión viral con la célula. Un paso importante en el ciclo de replicación del VIH, que representa una diana importante para poder intervenir terapéuticamente, es la entrada del virus en la célula huésped. Fármacos que bloquean esta entrada son conocidos y agrupados como inhibidores de la entrada del VIH, pero comprenden un complejo grupo de fármacos con múltiples mecanismos de acción. Este grupo puede ser subdividido en tres grupos que actúan en diferentes estados de la entrada: adsorción y unión-CD4, que son los agentes que bloquean la interacción gp-120-CD4, otros son los que bloquean la unión al correceptor y los que intervienen en la fusión virus-célula. Todos estos inhibidores los trataremos en profundidad en el apartado de microbicidas ya que muchos de ellos han sido evaluados como tales con resultados favorables. Actualmente, sólo han sido aprobados antagonistas que bloquean la unión CCR5 (*maraviroc*) y la fusión (*enfuvirtida*), aunque se están desarrollando estrategias para inhibir otros mecanismos

de la entrada del VIH. (Tilton & Doms, 2010). A continuación, se describen los fármacos más importantes de este grupo.

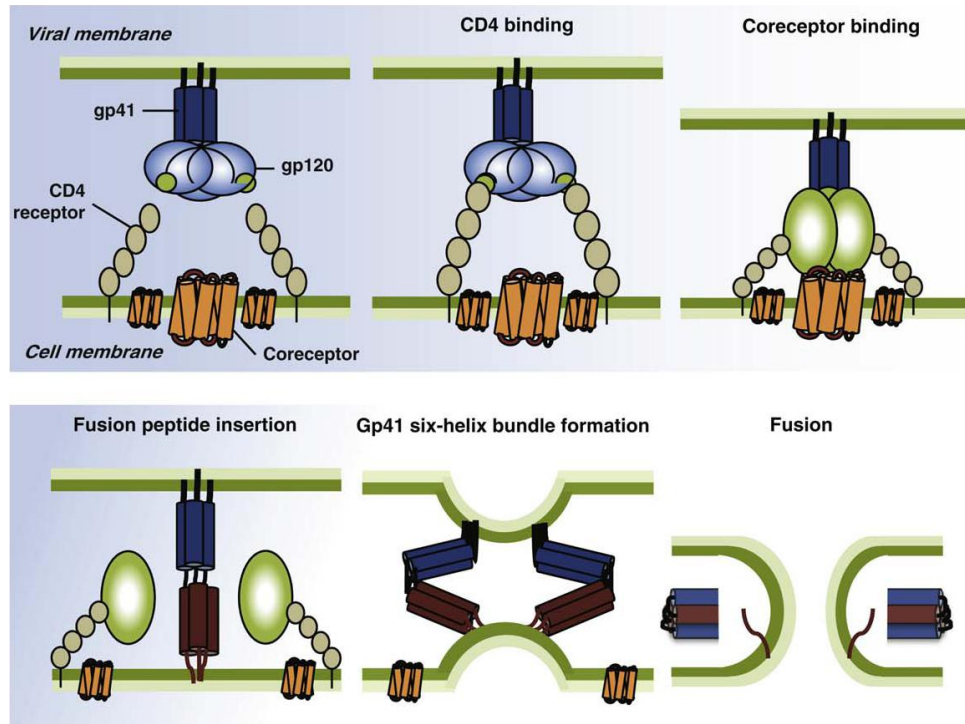


Figura 27. Etapas en el proceso de entrada del VIH. Permanyer *et al.*, 2006

Fármacos que bloquean la interacción de gp120- coreceptor: Maraviroc

Éstos inhibidores de la entrada, bloquean la interacción entre la glicoproteína gp120 de la superficie viral, y los receptores de la membrana plasmática y correceptores de la célula huésped. Uno de los correceptores es el CCR5 una proteína G tipo rodopsina acoplada a proteínas G.

Se ha demostrado que una buena estrategia para inhibir las interacciones gp120-coreceptor, es la actuación de pequeñas moléculas que se unen a un bolsillo hidrofóbico en la hélice transmembrana de CCR5, . Se cree que ejercen sus efectos antivirales alterando la conformación de los bucles extracelulares que interaccionan con VIH durante la unión al coreceptor (Este & Telenti, 2007; Permanyer, *et al.*, 2010; Tilton & Doms, 2010). Estos agentes no se unen al mismo sitio de unión que gp120, siendo inhibidores alostéricos más que inhibidores competitivos. Muchas moléculas pequeñas antagonistas han demostrado eficacia contra la replicación de VIH *in vitro* y tres de esos agentes se han probado en humanos. Estas actúan como antagonistas dobles, por un lado sobre actividad del receptor de quimiocina y por otro lado sobre la actividad vía coreceptor de la entrada del VIH. No obstante, esto no siempre es así, es decir, la inhibición en la función de la quimiocina no siempre da lugar a la inhibición

de la unión CCR5-gp120, ya que se ha visto que la proteína gp120 y las CC-quimiocinas se unen en diferentes regiones de CCR5. Lo deseable sería diseñar inhibidores que únicamente interrumpiesen la unión entre gp120-CCR5 y la entrada viral, sin actuar sobre la activación en la función de CCR5. Se trata de derivados espirodictetopiperazina, representados en la Figura 28, donde el más representativo es **aplaviroc** (GW873140), desarrollado en 2005, que fue probado en estudios fase IIb donde mostró hepatotoxicidad; **vicriviroc** (SCH-D, SCH-417690) está actualmente en estudios clínicos en fase III y es un compuesto de segunda generación basado en **ancriviroc** (SCH-C), el cual fue retirado después de asociarlo con la elongación del intervalo QT cardíaco en estudios clínicos; y **maraviroc** (UK-427857), que fue aprobado en 2007 para el tratamiento de pacientes infectados con VIH con replicación viral y cepas VIH resistentes a múltiples agentes antirretrovirales. Es el resultado de una optimización química del compuesto UK-107543. Impide la unión de la quimiocina CCL3; de esta manera, el VIH no puede unirse eficazmente a la superficie de las células T evitando de este modo que el virus infecte las células sanas. Esta desprovisto de actividad agonista CCR5, y por tanto es efectivo contra cepas con tropismo R5 en rango nanomolar bajo. Se administra oralmente dos veces al día con dosis que varían dependiendo del uso simultaneo de inductores CYP3A o inhibidores en el régimen antiviral. (Tilton & Doms 2010).

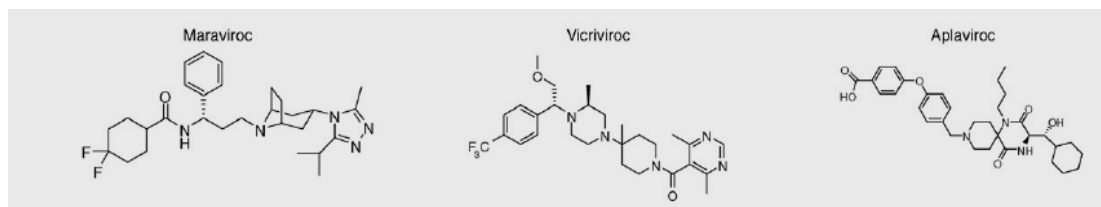


Figura 28. Derivados espirodictetopiperazina interrumpen la unión entre gp120-CCR5 y la entrada viral. Tilton & Doms 2010

Se utiliza como tratamiento de rescate, pero no es activo frente a cepas de VIH con tropismo por el correceptor CXCR4. Esto conduce a otra estrategia antiviral que sería utilizar antagonistas o agonistas parciales del correceptor CXCR4, los cuales se ha visto que podrían presentar actividad antiviral. Distintos agentes han sido probados, pero muchos de ellos han resultado ser inactivos, o hepatotóxicos. (Permanyer *et al.*, 2010).

Fármacos que bloquean gp41-mediador de la fusión de membrana

Estos fármacos fueron los primeros inhibidores de la entrada en ser aprobados para el tratamiento de la infección por VIH.

Enfuvirtida (T-20) es el primer inhibidor de la entrada del virus aprobado (Este & Telenti, 2007). Se une a la glucoproteína gp41 del VIH-1, impidiendo la fusión del virus con los CD4. Estructuralmente es un péptido sintético lineal de 36 aminoácidos, con una secuencia idéntica a parte de la región HR2 de gp41. No se administra vía oral. Hasta el momento esta siendo bien tolerado y sin interacciones farmacológicas conocidas. Se aplica como tratamiento de rescate frente a cepas de VIH-1 multirresistentes por vía subcutánea, y no es activo frente a VIH-2. Las resistencias que se producen con *enfuvirtida* son consecuencia de las mutaciones en una secuencia crucial de 10 aminoácidos (36-45) dentro de la región N-terminal de gp41, y en menor medida en algunas regiones del gen *env*, y es modulado por el uso de correceptores y correceptores densos en las células T CD4. Estas resistencias no afectan a la susceptibilidad del virus a otros inhibidores de la entrada.

Se están desarrollando un gran número de péptidos de nueva generación, los cuales presentan mejoras farmacodinámicas y eficacias comparadas con *enfuvirtida*. Adicionalmente, ciertos agentes son activos contra algunas cepas VIH resistentes a *enfuvirtida*, e inhibidores de la fusión que se unen a diferentes dominios funcionales de gp41 y pueden tener efectos sinérgicos. (Pan *et al.*, 2009). Sin embargo, no pueden ser administrados por vía oral, sino que deben ser inyectados. Una alternativa es la generación de *D*-péptidos inhibidores específicos de la entrada, que se unen a gp41, los cuales al contrario que *L*-péptidos, no son digeridos por proteasas, y tienen el potencial para administrarse vía oral. (Tilton & Doms, 2010).

Enfuvirtida

NH₂-F-W-N-W-L-S-A-W-K-D-L-E-L-L-E-Q-E-N-K-E-Q-Q-N-Q-S-E-E-I-L-S-H-I-L-ST-Y-Ac

3.2.3.2. Inhibidores de la Integrasa Viral

Raltegravir: actúa inhibiendo la acción de esta enzima, lo que bloquea la integración del ADN del VIH en el ADN de la célula. Esto impide al VIH integrarse en el genoma de la célula hospedadora para que produzca copias del ARN viral, reduciéndose así la presencia del VIH en el cuerpo humano. Es bien tolerado y presenta bajo potencial de interacciones. Se utiliza como tratamiento de rescate, pero presenta baja barrera genética, ya que con una sola mutación el virus escapa.

3.2.3.3. Inhibidores de la Transcriptasa Inversa

Los inhibidores de la TI pueden ser de dos tipos:

- Inhibidores de la TI Análogos de Nucleósidos (ITIANs)

- Inhibidores de la TI No Análogos de Nucleósidos (ITINANs)

Análogos de nucleósidos

Estructuralmente similares a los 2-desoxinucleótidos, son sustratos naturales con los que compiten por el sitio de unión a la TI. A diferencia de los no análogos, necesitan ser activados (trifosforilados) por enzimas celulares para poder ejercer su acción inhibidora. Esta acción es doble:

- Impiden el paso de ARN-ADN viral, al inhibir de manera competitiva a la TI (enzima que lleva a cabo la transcripción)
- Impiden la elongación del ADN complementario viral, al incorporarse a la cadena naciente del ADN provírico; actúan como terminadores de cadena, ya que al no poseer el 3'-OH necesario para la formación del enlace fosfodiéster que continúe la elongación de la cadena

Son activos frente a VIH-1 y VIH-2, y algunos activos frente a otros virus como HTLV-I y el virus de las hepatitis B. Existen asociaciones comercializadas, con buena disponibilidad oral en general: [zidovudina + lamivudina], [zidovudina + lamivudina + abacavir], [emtricitavina + tenofovir], y [emtricitavina + tenofovir + efavirenz]. Las resistencias que aparecen se deben a la aparición de mutaciones puntuales en el gen de la TI, y también existe posibilidad de resistencias cruzadas. La toxicidad de los ITIANs se debe a que también inhiben la ADN polimerasa de los mamíferos que replica el ADN mitocondrial, provocando la depleción del complejo de foforilación oxidativa dando lugar a reacciones adversas, la mayoría graves (polineuritis, pancreatitis, acidosis láctica, mielotoxicidad). Algunos ejemplos de estos fármacos se exponen a continuación.

Zidovudina o AZT, (3-azido- deoxí-timidina)

Es un análogo de desoxitimidina. Ya en el interior celular sufre fosforilación (trifosfato de AZT) y se activa, inhibiendo de ésta forma la síntesis de ADN por dos mecanismos:

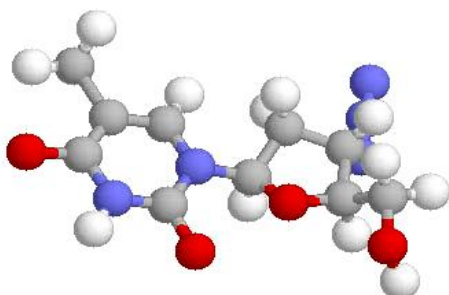


Figura 29. AZT.
www.pharmainformatic.com

- *Inhibición competitiva:* Se une a la TI por el mismo punto en el que se unen los nucleósidos normales

- *Terminación de la cadena de ADN:* la retrotranscriptasa confunde e incorpora en la cadena el trifosfato de AZT, en vez de insertar el nucleótido normal

Debido a su corta vida plasmática y su eliminación rápida, necesita administraciones muy frecuentes. Presenta toxicidad a

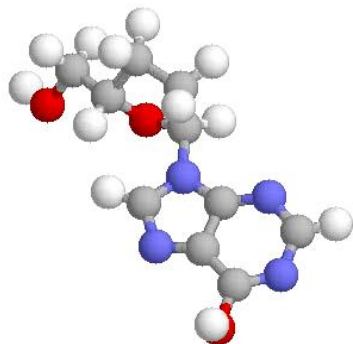


Figura 30. ddl
www.pharmainformatic.com

nivel de médula ósea, produciendo anemia y neutropenia, que además se acentúa con la administración conjunta con *ganciclovir*. Se producen resistencias, que son más intensas cuando la carga viral es mayor.

Didanosina (ddl), (2,3-di-deoxi-inosina)

Es análogo de desoxiadenosina. En el interior celular se transforma en ddl-monofosfato, que tras varias transformaciones llega a la forma activa ddA-trifosfato. Su mecanismo de acción es similar al del AZT, con vida media superior, y además es activo frente a cepas resistentes al AZT. Como efectos secundarios más frecuentes, se presentan la neuropatía periférica y pancreatitis aguda

Estavudina (d4T) (2'3'-dideshidro-3'-didesoxitimidina)

Es un análogo de timidina. Se trifosforila para llegar a la forma activa y su mecanismo es similar a los anteriores.

Es más tóxico que AZT, sobre todo a nivel de la médula ósea, produciendo neuropatía periférica, y mayor hepatotoxicidad. Es útil en tratamiento de inicio o en pacientes que no responden a otros tratamientos.

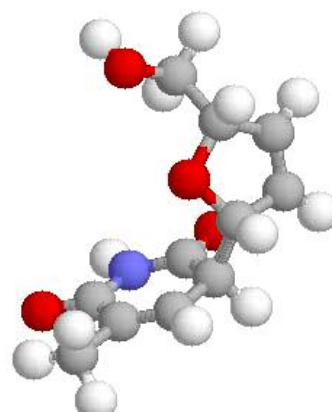


Figura 31.d4T
www.pharmainformatic.com

Lamivudina (3TC), (di-desoxi-tiacidina)

No presenta anillo de ribosa en su estructura. Se administra conjuntamente con AZT, ya que las mutaciones que inducen resistencia al 3TC, son incompatibles con las que determinan la resistencia al AZT. Como tratamiento de inicio en pacientes *naïve*. Junto con *INF-α pegilado*, es usado también en el tratamiento de hepatitis B crónica activa.

Zalcitavina (ddC), (2,3-di-desoxi-citidina)

Es un análogo de histidina. Presenta elevada actividad anti-VIH, pero su utilización se ve muy restringida debido a su elevada toxicidad sobre el sistema nervioso. Provoca neuropatías periféricas, cuadros de hipersensibilidad, cardiopatía, estomatitis y fiebre.

Abacavir (ABC)

Es un análogo carbocíclico de la guanosina, Actúa como profármaco, ya que se transforma en *carbovir* (forma activa), que posteriormente es trifosforilado. Por su potencia, buena biodisponibilidad por vía oral, alta barrera genética y escasos efectos adversos, (baja toxicidad mitocondrial, pero puede producir una reacción de hipersensibilidad grave, fatal si no se retira la medicación), se le considera un ITIAN de segunda generación.

Tenofovir-disoproxil-fumarato

Es un análogo acíclico de adenina. Único ITIAN “nucleótido” y “prefosforilado”. Es un profármaco; se convierte en *tenofovir* activo. Presenta buena tolerancia, baja toxicidad mitocondrial y escasas interacciones, aunque existe la posibilidad de alteraciones renales. Está indicado en terapia de rescate en pacientes pretratados (multiresistentes). Además, es el componente del primer medicamento microbicida, que ha mostrado eficacia en ensayos clínicos y del cual se trata más extensamente en el apartado de microbicidas

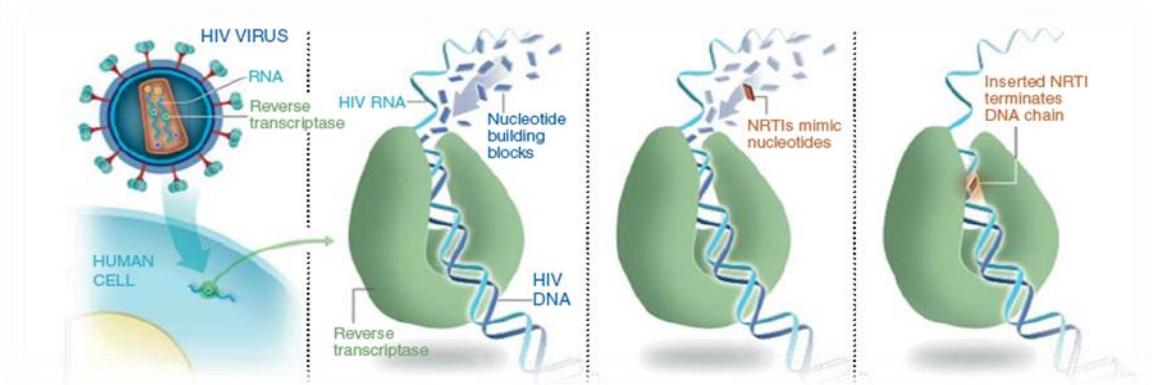


Figura 32. Mecanismo de acción del tenofovir. Shattock *et al.*, 2012.

No análogos de nucleósidos

No son estructuralmente similares a nucleósidos, e inhiben de forma selectiva pero no competitiva, a la TI. Su acción no es doble (no actúan como terminadores de cadena). No requieren activación previa y sólo son activos frente a VIH-1. No inhiben la ADN polimerasa en humanos, por lo que no producen toxicidad mitocondrial. Son potentes inductores enzimáticos del citocromo hepático CYP-450, con gran potencia antirretroviral y buena biodisponibilidad oral. Tienen baja barrera genética (rápida aparición de resistencias y resistencias cruzadas). Ejemplos de fármacos de este grupo son:

Efavirenz: es una benzoxacinona. Sus principales efectos adversos son los neuropsicógenos. Asociado a AZT y 3TC, es uno de los regímenes más usados actualmente en el tratamiento de inicio en pacientes infectados.

Etravirina: nuevo ITINAN que demuestra actividad antiviral en pacientes con virus resistentes a otros ITINANs. Es utilizado como tratamiento de rescate. Se administra por vía oral, dos veces/día y con comida. Su reacción adversa mas destacable es la erupción cutánea.

3.2.3.4. Inhibidores de la Proteasa

Inhiben la enzima PR aspártica del VIH, que cataliza la ruptura de precursores polipeptídicos para dar lugar a proteínas virales. Esto provoca la formación de partículas virales inmaduras (no infecciosas). Son más selectivos frente a VIH-1. pero también son activos frente a VIH-2. No requieren activación celular, y son también eficaces en células en reposo. Se administran por vía oral, pero presentan baja biodisponibilidad y muchas interacciones con otros medicamentos (inhiben el CYP-450). En cuanto a sus reacciones adversas, en general son leves, intolerancia gastrointestinal y modificación de parámetros de laboratorio (hiperglucemia, enzimas hepáticas, bilirrubina, ácido úrico). Destacar el síndrome de lipodistrofia (distribución atípica del tejido adiposo), hiperlipidemia, diabetes y el sangrado en pacientes hemofílicos. Se utilizan para tratamiento de inicio y de rescate (en combinación con ITIANs).

Los fármacos más representativos de este grupo son *saquinavir*, *ritonavir* e *indinavir*, que son péptidos sintéticos de baja toxicidad *in vitro*. Su mecanismo se produce por ser peptidomiméticos semejantes al sustrato natural de la PR, bloqueando su acción.

Presentan una baja vida media y debe actuar con gran especificidad sobre proteasas del VIH, lo que supone un inconveniente.

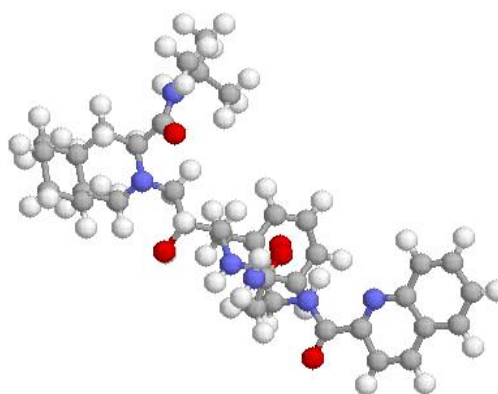


Figura 33. Saquinavir
www.pharmainformatic.com

3.2.3.5. Inhibidores de la maduración

El fármaco más representativo de este grupo es el *Bevirimat*, que funciona impidiendo que las proteínas y partículas producidas en la célula infectada, se

articulen para formar una nueva copia del VIH. Esto reduce el número total de viriones presentes en el organismo.

3.2.4 Antivirales de amplio espectro

3.2.4.1. Interferón

Los IFNs son un grupo de pequeñas glucoproteínas, producidas y liberadas por las propias células como respuesta a diferentes estímulos (virus, tumores, respuesta inmunitaria,...), que incrementan la resistencia de las células frente a los virus. Para ello se unen a la membrana plasmática de otra célula, induciendo ese estado antivírico. Son muy potentes, una concentración tan baja como 10^{-11} M tiene un efecto antivírico significativo.

Hay tres tipos de IFNs: α y β producidos por células linfoides, epiteliales y linfoblastos, y el IFN- γ producido por linfocitos T activados y células NK. Cada interferón tiene efectos biológicos y características fisicoquímicas diferentes. Su actividad antiviral no es directa, sino que inducen la síntesis de ciertas proteínas que actúan en las células expuestas de muy distintas formas en función del virus o tipo celular.

Solo se dispone comercialmente del *interferón α* , obtenido por ingeniería genética. Se administra por vía subcutánea o intramuscular, con una vida media corta, pero su actividad antiviral dura varios días. Se han producido interferones pegilados a los que se une polietilenglicol, aumentando con ello la vida media y el efecto antiviral. A dosis bajas va a producir un síndrome parecido a la gripe. Pero pueden aparecer efectos secundarios más graves como trastornos psiquiátricos, depresión y toxicidad a nivel de médula ósea. Esta indicado en hepatitis crónicas, virus de la hepatitis B y virus de la hepatitis C, sarcoma de Kaposi, en VIH (actúa sinérgicamente con AZT y otros), condiloma acuminado, y otras infecciones víricas.

3.2.4.2. Ribavirina

Es un análogo sintético de guanosina, Por vía inhalatoria puede ocasionar irritación conjuntival y erupciones cutáneas. Por vía intravenosa, reduce la hemoglobina y el hematocrito, produciendo anemia. Es teratógeno. Tiene acción terapéutica de amplio espectro por vía oral, y asociada a INF- α (vía subcutánea); es tratamiento de elección de la hepatitis C crónica activa, Y por vía inhalatoria para bronquiolitis grave infantil por virus respiratorio sincitial. Finalmente, en la Tabla 6 se describen las propiedades y efectos adversos de los fármacos antivirales más utilizados clínicamente en la actualidad.

4. MICROBICIDAS

4.1. Introducción

Actualmente, no es posible erradicar la infección por el VIH una vez establecida, por lo que la búsqueda de métodos preventivos, principalmente de la infección por vía sexual, es especialmente importante. Los principales métodos preventivos son las vacunas y los microbicidas. Hasta el momento no se cuenta con una vacuna segura y eficaz, ya que esta debe reunir una serie de condiciones especiales que no se ajustan al paradigma de las vacunas comunes (Figura 49), y esto hace que sea mucho mas complicado.

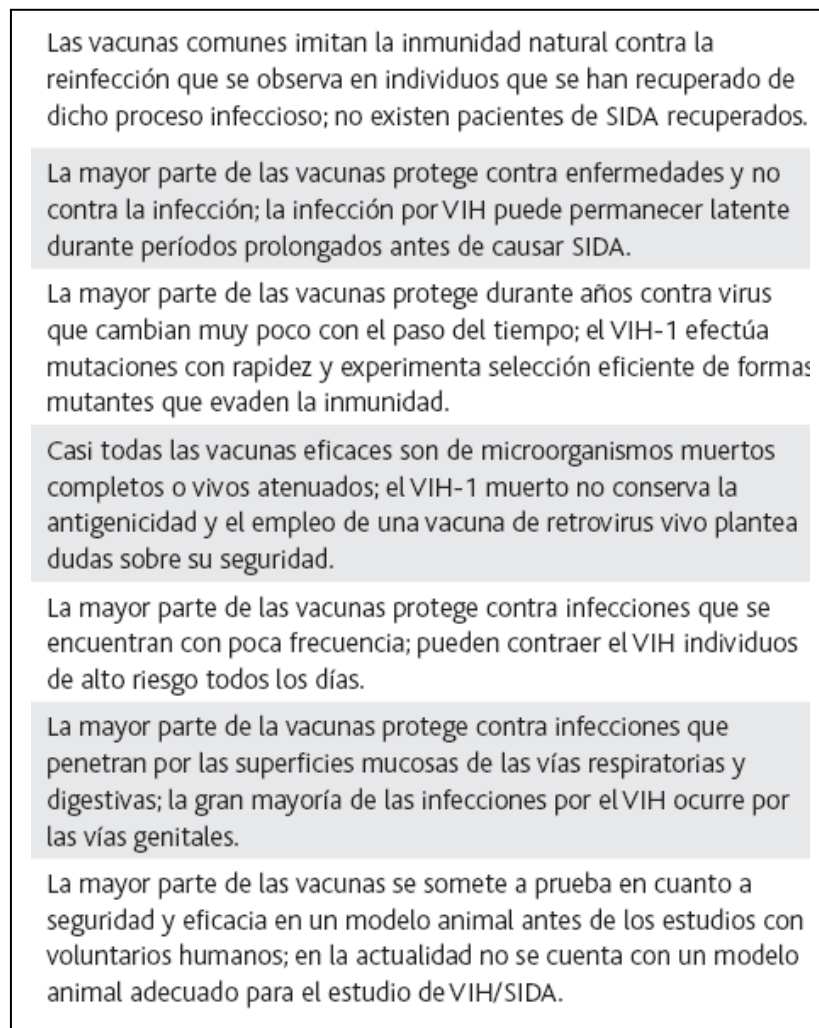


Figura 34. Razones por las cuales el SIDA no se ajusta al paradigma para desarrollo de las vacunas comunes. Inmunología de Kuby 2007

El estudio **STEP**, estudio en fase IIb, fue llevado a cabo por la red de estudios de vacunas contra el VIH y los laboratorios Merck, contó con la participación de 3000 pacientes, voluntarios de diferentes países, fue diseñado para probar la vacuna trivalente de Merck, la MRKAd5 y su objetivo era estimular la producción de células T

para que así pudieran ser destruidas las células infectadas por VIH, se pretendía determinar si la vacuna podía evitar la infección por el VIH, reducir la cantidad de individuos que desarrollaran la infección o ambas cosas. no mostró ninguna protección ni ninguna modificación de la replicación viral en los pacientes infectados, y entre los no infectados se produjeron infecciones aunque aumentó la defensa inmunológica (Buchbinder *et al.*, 2008).

En un ensayo realizado en 2009 en Tailandia, en el que participaron más de 16.000 personas, heterosexuales utilizando una vacuna basada en un vector recombinante de viruela de canario con una proteína del VIH recombinante (gp120), dio como resultado una reducción del 31% de la incidencia de la infección por VIH sin afectar al grado de viremia o al número de los linfocitos T en aquellos individuos que se infectaron (Rerks-Ngarm *et al.*, 2009).

Actualmente, el enfoque científico va encaminado a diseñar vacunas candidatas contra el VIH, con base en los conocimientos de la estructura proteínica de las espigas superficiales que el VIH usa para fijarse a las células humanas e infectarlas. Estas espigas tienen sitios que son vulnerables a potentes anticuerpos que bloquean la infección de células humanas *in vitro* en más del 90% de las cepas de VIH de todo el mundo evaluadas. Ahora, los científicos trazan una estrategia para crear una vacuna que pueda estimular en una persona sana la síntesis de tales anticuerpos neutralizantes de amplio espectro. Sin embargo, sin importar cuán eficaz es una vacuna preventiva contra el VIH, es necesario evaluarla y administrarla en combinación con otras herramientas de prevención de la infección por el VIH, biomédicas y del comportamiento. Ninguna estrategia de prevención del VIH controlará y erradicará la pandemia de VIH/SIDA por sí sola. Por eso, es importante la investigación de microbicidas vaginales y rectales y la profilaxis previa a la exposición

4.2. Eventos iniciales de la infección

Los microbicidas son fármacos aplicados en las mucosas para evitar la infección por microorganismos y tienen que ser eficaces y seguros. El VIH, para infectar las células diana, debe evitar una serie de barreras mecánicas, químicas y biológicas intrínsecas. La estructura del tracto genital femenino constituye la primera línea de defensa contra el VIH. (Kaushic *et al.*, 2010). Por ello, el VIH recurre a una serie de mecanismos principales de transmisión viral: una primera ruta de entrada en la que viriones solubles se unen a las células hospedadoras a través de una interacción con sus receptores; otro mecanismo surge por contacto célula-célula, en el

cual no se liberan viriones al medio; y el último, denominado sinapsis viral, que es llevado a cabo por células presentadoras de antígenos, como son principalmente las células dendríticas, que pueden capturar las partículas virales vía receptores de lectinas tipo C (DC-SIGN), para luego presentarlas a los linfocitos CD4+. Este último mecanismo incrementa la eficiencia de la infección y previene la neutralización por anticuerpos o el sistema del complemento, y se ha considerado por tanto como la diana más importante de los microbicidas (Figura 35).

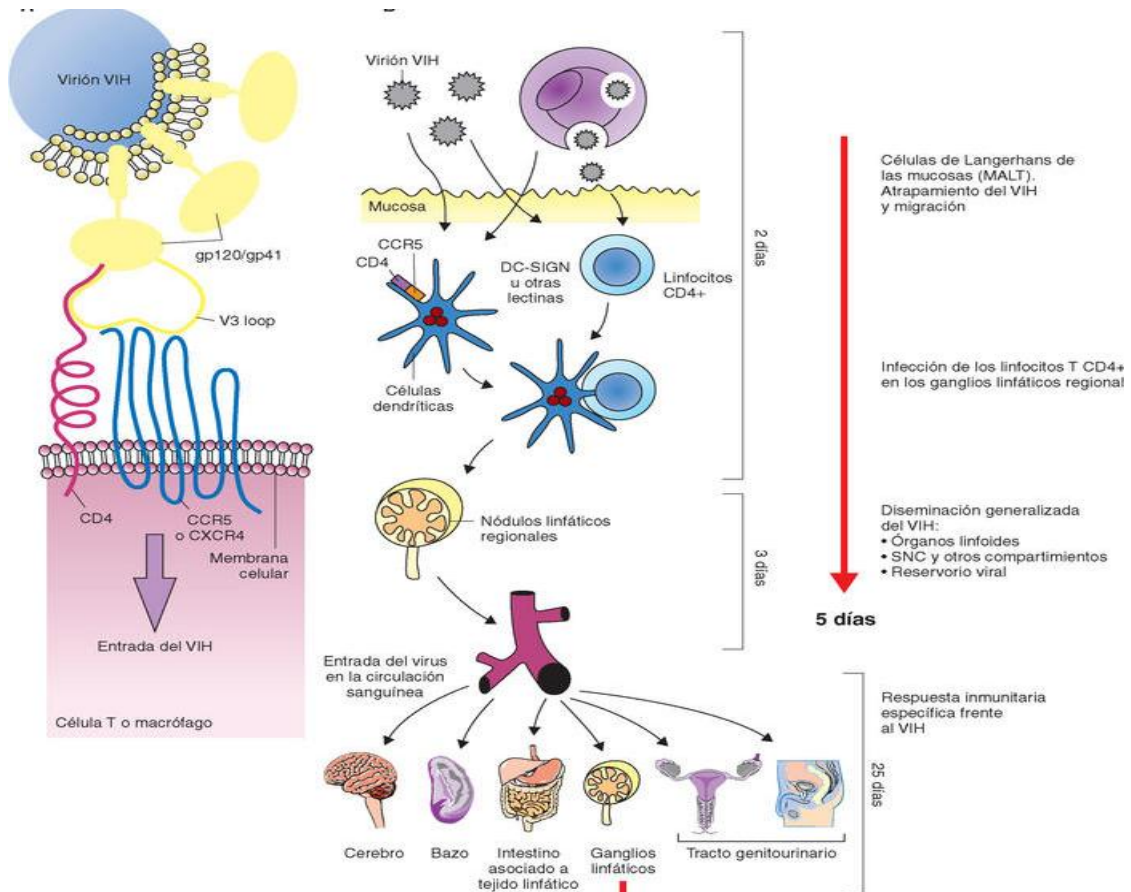


Figura 35. Fases iniciales de la infección por VIH. Miro *et al.*, 2004

Estos tres mecanismos son capaces de producir infecciones productivas por contacto sexual. En general, el tracto genital femenino se puede dividir en dos compartimentos que pueden ser infectados por el VIH-1, el tracto reproductivo inferior que consiste en la vagina y ectocervix, tapizado por epitelio escamoso estratificado y extracto reproductivo superior consistente en endocervix, endometrio y trompas de Falopio tapizado por una capa sencilla de epitelio columnar. (Wira *et al.*, 2005). El VIH puede infectar la mucosa rectal, vaginal, ectocervical y endocervical. La mucosa rectal resulta ser mucho más frágil y es muy susceptible a la infección. Mientras que la vagina presenta en las zonas más susceptibles un epitelio estratificado, la mucosa

rectal sólo presenta un epitelio simple en monocapa. Además, la lámina propia intestinal contiene una alta concentración de células presentadoras que facilitan enormemente la infección. Estos cambios histológicos e inmunológicos entre la mucosa vaginal y la rectal tienen por supuesto implicaciones en la aplicación de microbicidas. (Fletcher *et al.*, 2006), (Rohan *et al.*, 2013). La multicapa escamosa del epitelio que cubre la vagina y el ectocervix, cuando esta intacta, proporciona una mejor protección mecánica contra la invasión por VIH, que el epitelio columnar monocapa que cubre el endocervix. Generalmente la mayoría de las células implicadas en la transmisión del VIH son células CD4 DCs y células T que forman parte de la lámina propia de la mucosa genital, por ello la mayor población de este tipo de células en la zona de transición entre endocervix y ectocervix puede ser un lugar particularmente susceptible a la infección y entrada del VIH. (Pudney *et al.*, 2005). Sin embargo, la mayor superficie de la pared vaginal y la ectocérvix, muy superior a la endocérvix, incrementará el riesgo de transmisión viral, particularmente cuando se produce erosión o rotura como consecuencia de prácticas sexuales (Hladik & McElrath, 2008). Por tanto, la transmisión selectiva del VIH a través de la mucosa vaginal es más común que la producida a través del cérvix (Padian *et al.*, 2007).

En cuanto a los leucocitos, la ectocervix es potencialmente mas vulnerable que la mucosa vaginal, ya que contiene mayor cantidad de linfocitos T CD-4 , macrófagos y células dendríticas; esto favorece la infección, que será menos probable también en la endocervix que posee el menor número de linfocitos T, y macrófagos y no contiene células dendríticas.

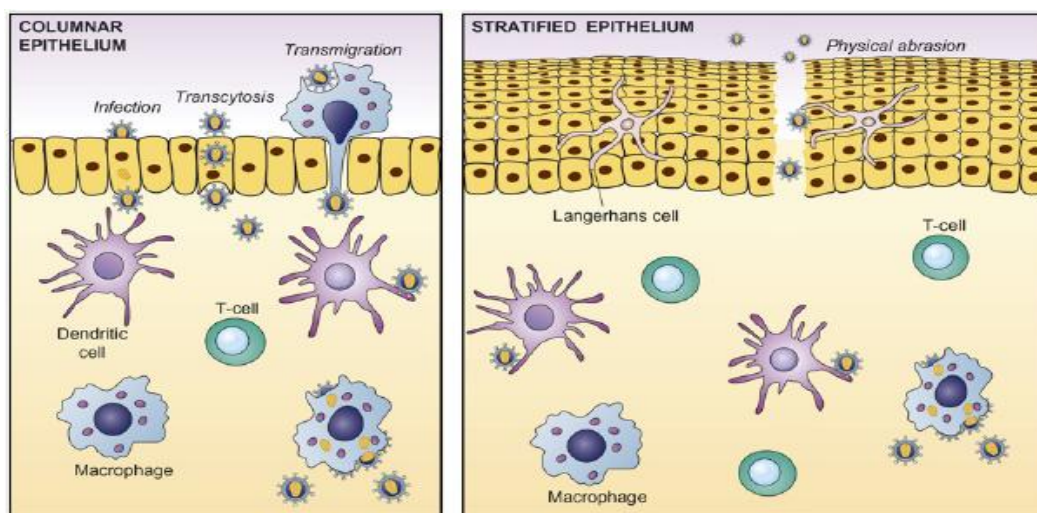


Figura36. Transmisión del VIH a través de la mucosa por distintos caminos, donde participan células T CD4, macrófagos y células dendríticas. McGowan *et al.*, 2006

Las células epiteliales en el tracto genital femenino producen diversos factores que crean un ambiente inhóspito para el VIH, tales como una capa superficial hidrofílica protectora de glucoproteínas y glucolípidos llamada glicocalix, y un mucus hidrofóbico glucoproteínico. Ambos, el glicocalix y el mucus actúan como barreras de la mucosa (Kaushic *et al.*, 2010).

Los viriones que son inicialmente libres, y aquellos que son liberados desde células infectadas donadoras seminales, interactúan con las células epiteliales, y atraviesan el epitelio a través de múltiples caminos, incluyendo transcitosis, endocitosis y subsecuente exocitosis, causando infección productiva, o simplemente por penetración a través de huecos entre las células epiteliales. Diversas proteínas expresadas en la superficie de las células epiteliales pueden mediar el ataque del VIH, dos glucoesfingolípidos de la superficie celular, lactosilceramida sulfatada, expresada por las células epiteliales vaginales, y galactosilceramida expresada por células epiteliales ectocervicales, uniendo HIV gp120 y fomentando la transcitosis. Interacciones de gp120 con proteoglicanos heparan sulfato transmembrana expresados por el epitelio genital pueden también contribuir al ataque y entrada del VIH. (Hladik & McElrath, 2008).

4.3 Importancia del buen estado de la mucosa

El riesgo de transmisión del VIH por el acto coital es relativamente infrecuente siempre y cuando la mucosa permanezca inalterada, no se trate de un individuo susceptible y su pareja no posea infecciones (Dosekun & Fox, 2010). Es importante destacar que el mal estado de la mucosa favorece la infección por VIH, es por ello que la inflamación resulta ser un factor determinante a la hora de exponer las células que forman parte de la mucosa con el VIH. Microabrasiones mecánicas de la superficie mucosa, inducida por el coito, pueden también permitir el acceso directo del VIH a células diana, tales como DCs, células T, y macrófagos en el epitelio basal. El riesgo de transmisión por tanto es favorecido si la flora normal es destruida o alterada, si se reducen los factores innatos de protección, o si se daña o inflama la integridad del epitelio protector de la mucosa. (Haase *et al.*, 2011).

Diversas causas pueden provocar inflamación, quizás la mas significativa y mas estudiada sea la alteración en la microflora vaginal (vaginosis bacteriana) y las enfermedades de transmisión sexual (ETS). Otros potenciales inductores son, además de las microabrasiones, la higiene íntima con antisépticos, las proteínas en el plasma seminal y los lubricantes, así como los cambios hormonales. (Roberts *et al.*, 2012)

Los métodos disponibles para prevenir la infección por VIH incluyen preservativos, la circuncisión masculina e intervenciones en el comportamiento, pero hay datos que indican que esto es insuficiente para la mujer. En la mujer subsahariana uno de los mayores riesgos de contraer la infección son las relaciones estables a largo plazo donde el uso del preservativo es muy bajo y que no pueden persuadir a sus parejas del uso del mismo. Los microbicidas son productos tópicos, tales como geles, cápsulas, tabletas, films, anillos intravaginales, diseñados para ser aplicados durante el tiempo del coito. El objetivo es la inhibición o el bloqueo de las etapas tempranas en el proceso de infección en la vagina o mucosa rectal. Al ser de acción tópica local, grandes concentraciones de fármaco se liberan exponiéndose a la superficie viral, sin producir por ello una exposición sistémica significativa (Shattock *et al.*, 2012). Microbicidas o formulaciones tópicas de agentes antiVIH mejoran la protección inactivando directamente al virus o previniendo su ataque. Deben ser seguros y efectivos, ya sea por administración vaginal o rectal, y deberían causar mínimos o ningún efecto secundario a largo plazo o en aplicaciones repetidas (Huskens *et al.*, 2008).

4.4 Antivirales como microbicidas con mecanismo de acción inespecífico

Los microbicidas vaginales, formulados como geles, cremas, films o anillos, han sido desarrollados inicialmente como una opción en la prevención de la transmisión del VIH en mujeres, que puede reducir la transmisión hombre-mujer del VIH, y posiblemente otras ETS (Skoler-Karpoff *et al.*, 2008). La aplicación de microbicidas como método de prevención de la infección por VIH, se lleva estudiando casi dos décadas sin embargo, casi todos los compuestos estudiados han fracasado en ensayos clínicos por problemas de seguridad. En este sentido, se trató de compuestos que no solo fallaban en la prevención de la transmisión de la enfermedad sino que en algunos casos aumentaban el riesgo de padecerla (Segarra *et al.*, 2011). El espermicida *nonoxinol-9* fue el primer compuesto probado por su potencial como microbicida- Exhibió *in vitro* actividad contra VIH-1 y otras infecciones de transmisión sexual. Sin embargo, en estudios clínicos en fase II/III no ejerció efectos protectores contra la transmisión del VIH-1 en mujeres al ser utilizado con baja frecuencia, y además causó un aumento en el riesgo de infección y transmisión del VIH-1 cuando se usaba mas de tres veces al día, además de efectos secundarios tóxicos (McGowan *et al.*, 2006).

El *sulfato de celulosa* presenta una larga cadena de polisacárido sulfatado, y esta siendo estudiado como contraceptivo y microbicida; actúa inhibiendo tanto R5 como X4, ya que se une a V3 de gp-120 del VIH (Scordi-Bello *et al.*, 2005). Parece

presentar gran actividad *in vitro* en un amplio espectro de patógenos responsables de enfermedades de transmisión sexual (McGowan, 2006). Ensayado como microbicida resultó ser seguro en un estudio en fase I; sin embargo, un estudio en fase III fue interrumpido pues resultados preliminares indicaron un incremento en el riesgo de transmisión del VIH, comparado con placebo (25 frente a 16 nuevas infecciones). Parece ser que presentó capacidad irritante de la mucosa, dando lugar a un proceso inflamatorio que ayudaba a la infección. Actualmente sabemos que la inflamación de las mucosas es un activador importante de la infección (Ashley *et al.*, 2010). Estos resultados han provocado la necesidad de desarrollar y validar mas biomarcadores preclínicos predictivos de seguridad y eficacia. Desarrollar modelos de transmisión del VIH es particularmente difícil porque muchos de los parámetros clave son todavía desconocidos: dosis inoculada o difíciles de simular, y los efectos del sexo y el semen en la infección. En 2011, se han puesto a prueba geles para poner a punto modelos de evaluación de seguridad para todos los productos de este tipo. (Segarra *et al.*, 2011).

El *lauril sulfato sódico* es un potente surfactante inhibidor de virus con envuelta (VHS y VIH), así como sin envuelta (papiloma virus, rotavirus y poliovirus); es llamado el “condón invisible”, pues es un agente en forma líquida a temperatura ambiente que cubre la pared vaginal y que gelifica en contacto con la mucosa. Presenta una formulación en gel termoreversible, proporcionando una barrera física y química (Piret *et al.*, 2002). El *lauril sulfato sódico* es espermicida y microbicida, y su mecanismo de acción engloba una combinación de disolución de la envuelta viral con una desnaturalización de la envuelta o de las proteínas de la cápside, destruyendo el virus (Haineault *et al.*, 2003). Estudios de seguridad en fase I y II, realizados en Camerún con resultados óptimos en cuanto a tolerancia, fueron publicados en el 2010 (Mbopi-Keou *et al.*, 2010). Este surfactante está siendo utilizado en el recubrimiento de nanopartículas cargadas negativamente con antiretrovirales como la daviplirina.

4.5 Antivirales como microbicidas que inhiben la entrada viral: bloqueando la interacción gp120-CD4

La glicoproteína del virus gp-120 se une al receptor CD4 en la célula, y sufre cambios conformacionales lo que facilita su unión a los correceptores CR5 y CXCR4. En contraste con el receptor CD4 presente en la membrana celular y que es requerido para la entrada del VIH, CD4 soluble (CD4s) parece inhibir la entrada a altas dosis *in vitro*. Estudios *in vitro* demuestran que la molécula soluble de CD4 sintética, una pequeña proteína obtenida por ingeniería genética, se une a la glicoproteína de la envuelta viral gp120, evitando de ésta forma la fusión de la partícula vírica con los

linfocitos y sin efectos tóxicos, aunque tiene una vida media muy corta. (Van Herrewege *et al.*, 2008). Sin embargo, presenta un inconveniente y es que la administración clínica de esta proteína no reduce la carga viral en pacientes infectados con VIH, y análisis detallados revelan que los niveles de CD4s conseguidos no fueron suficientes para inhibir VIH aislados primarios.

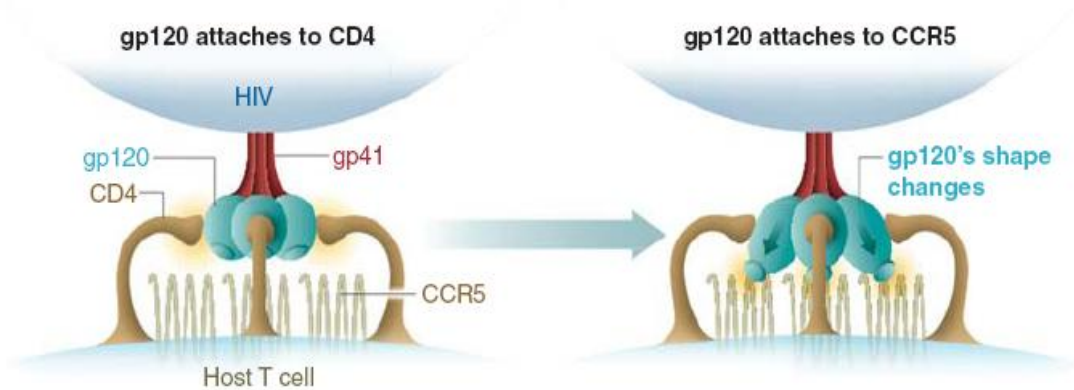


Figura 37. Primer estadio en la infección por VIH. Shattock *et al.*, 2012.

La *ciclotriazadisulfonamida* (CADA), ha sido descrita como inhibidor de la infección por VIH y VHS-7, por modulación del receptor CD4. La actividad antiviral de una larga serie de derivados de CADA se relaciona con su capacidad para modular la expresión del receptor. CADA es específico de CD4 y no altera la expresión de ningún otro receptor celular (ej. CXCR4, CCR5), presenta un mecanismo de acción diferente a los *aurintricarboxílicos* que se unen al CD4 directamente, regula a la baja la expresión de CD4 a nivel postransduccional. Si ello prueba seguridad podría representar un buen candidato para ser probado como microbicida; además presenta una acción sinérgica al ser combinado con NRTIs (*zidovudina*, *lamivudina*, *zalcitabina* y *abacavir*), y NtRTIs (*tenofovir*) y NNRTIs (*nevirapina*, *delavirdina*), IPs (*lopinavir*, *indinavir*, *saquinavir*, *ritonavir*), también con el inhibidor de la gp41 fusión T20 (*enfuvirtida*), el antagonista CXCR4 AMD3100, y las lectinas de plantas manosa específicos de *G. nivalis* e *H. hybrid* (De Clerck *et al.*, 2004; Vermeire *et al.*, 2008).

Otras pequeñas moléculas inhibidoras de la interacción en la unión gp120-CD4 son los compuestos *BMS-378806* y *BMS-488403*, cuya estructura se presenta en la Figura 38. Estos agentes también actúan sobre el sitio de unión CD4 de gp120 pero su mecanismo de acción preciso no está claro. Algunos estudios sugieren que compiten con CD4s por la unión a gp120, mientras otros indican que no bloquean la unión de

CD4s, y puede ejercer sus efectos por prevención de los cambios conformacionales de gp120. Otros estudios apoyan que previene el ataque sobre el receptor CD4 pero además sobre el co-receptor CCR5 (Guo *et al.*, 2003). La utilidad clínica de BMS-806 está limitada por una pequeña barrera genética para la resistencia.

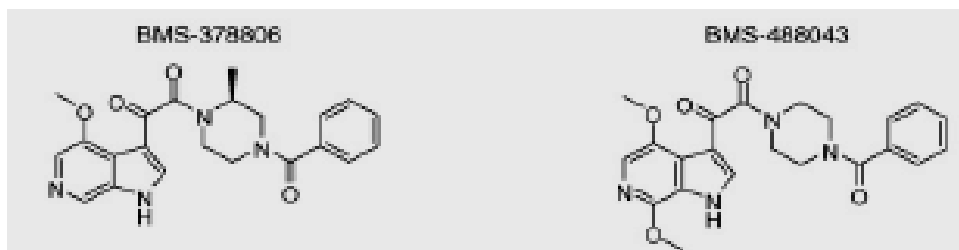


Figura38. Fármacos que inhiben la interacción gp120-CD4. Guo *et al.*, 2003

Una estrategia adicional para bloquear la interacción entre CD4 y gp120 es actuar sobre el receptor CD4 usando anticuerpos. El anticuerpo humanizado *ibalizumab* (TNX-355) se une a los dominios D2 de CD4 y bloquea la inducción de los cambios conformacionales en gp120. Se ha demostrado que reduce la carga viral incrementando el nivel de T CD4 solo y en combinación con terapia antiretroviral optimizada. Ha demostrado seguridad en ensayos de fase I y II, y en la actualidad se esta llevando a cabo un ensayo en fase I de prevencion con no infectados.

Los **inhibidores polianiónicos** comprenden un grupo de compuestos que son generalmente considerados inhibidores de la entrada. La mayoría de los mecanismos de actividad anti-VIH considerados en estos compuestos están relacionados con interacciones electrostáticas con la glicoproteína gp-120 de la envuelta viral, que en última instancia previenen la unión del virus con la célula diana. Estos compuestos han sido estudiados *in vitro*, en ensayos de citotoxicidad y mecanismos de acción *ex vivo* de transmisión del VIH, y eficacia y toxicidad en modelos animales *in vivo* (Pirrone *et al.*, 2011). Algunos de estos compuestos han sido probados en ensayos clínicos. Vamos a tratar de describir algunos de los más importantes:

Se han descrito polisacáridos extraídos de *Fucus vesiculosus*, un alga parda marina, que actúan a nivel de la entrada del VIH en la célula huesped. Se trata de **polisacáridos sulfatados** cuya actividad antiviral depende precisamente del grado de sulfatación de la molécula (Bruñi *et al.*, 1996).

Extraído también de un alga parda, el SPMG, se identifica como un polimanuroguluronato sulfatado, con aproximadamente 1,5 y 1 grupos sulfato y carboxílico respectivamente por residuo azucarado, y un peso molecular aproximado de 10kDa, introducido en estudios clínicos en fase II en China, resultando ser uno de

los primeros candidatos a ser aprobado como fármaco antirretroviral de naturaleza polisacárido y de origen marino. En estudios *in vitro* e *in vivo* inhibió la replicación del VIH, interfiriendo con la entrada del VIH en los linfocitos T. También se ha demostrado que *Tat* (factor de transactivación del VIH) presentaba una gran afinidad de unión por el polisacárido vía su dominio básico, inhibiendo de ese modo además, el tumor más común en pacientes infectados por VIH, el sarcoma de Kaposi, una causa importante de mortalidad y morbilidad en pacientes infectados por VIH, que se ha demostrado que es inducido por *Tat* (Lu *et al.*, 2007 ; Sullivan *et al.*, 2009). Recientemente, se ha puesto de manifiesto otro sitio de unión del SMPG el dominio KKR, que también afecta directamente a dicho tumor (Yan-lin *et al.*, 2011).

Extraído de un alga roja, la *Asparagopsis armata* (Haslin *et al.*, 2001) identifican un polisacárido con galactosa:3,6 anhidro galactosa:sulfato, que es capaz de inhibir la replicación del HIV a nivel de la formación de sincitios y a nivel de la inhibición de TI. La máxima actividad antiviral implica la presencia del polisacárido durante la infección o después, pero no antes. El galactan sulfato extraído de *Agardhiella tenera* (Gigartinales, Areschongiaceae), mejora la protección contra el efecto citopático del VIH-1 (HTLVIII_B) y VIH-2 (LAV-2ROD), a una concentración diez veces mayor que la concentración de *sulfato de dextrano* (CI₅₀ 0.5 y 0.05 µg/mL, respectivamente) (Bourgougnon *et al.*, 2003). Anteriormente, estos autores también describieron la variación en la composición y en la actividad anti-VIH-1 *in vitro* en el glucuronogalactano sulfatado de *Schizymenia dubyi* (Rhodophyceae). Este polisacárido suprimió la formación de sincitios y la TI asociada, a una concentración de 5 µg/mL. Esta actividad anti-VIH-1 se correspondía con un decrecimiento en la viscosidad, y en los contenidos de L-galactosa y sulfatos en el polisacárido. El mecanismo de acción anti-VIH, se atribuye generalmente a la inhibición del ataque del virus a la superficie celular por interacciones iónicas entre polisacáridos y células (Ghosh *et al.*, 2009). Para que la inhibición sea efectiva es necesaria la preincubación de las células con los polisacáridos sulfatados con las células antes del contacto con virus (Bouhlal *et al.*, 2011)

Nuevos polisacáridos extraídos de algas rojas, como *Grateloupia filicina* y *Grateloupia longifolia*, con un contenido en sulfato del 25,7 y 18% respectivamente, presentaron una potente actividad anti-VIH-1 cuando se añadieron al mismo tiempo de infección, y dos horas post-infección, presentando además una baja citotoxicidad. (Wang *et al.*, 2007a). Todos ellos inhiben la entrada del VIH debido a la interacción directa con el bucle V3 de la gp120 viral. Esta aproximación, ofrece la capacidad de atacar un proceso que implica tanto a receptores celulares como a ligandos virales, pudiéndose

llegar, hipotéticamente, a la detención de la infección y de la muerte de células no infectadas. El principal inconveniente de estos compuestos parece ser su baja biodisponibilidad por vía oral, y la trombocitopenia en administración intravenosa; esto provoca que únicamente puedan ser utilizados como antivirales de uso tópico. (de Clerq *et al.*, 1995). Los retrovirus y mixovirus sensibles a la acción inhibitoria de estos polisacáridos, comparten un segmento peptídico compuesto por tres aminoácidos, que podría estar relacionado con la acción inhibitoria de estos compuestos (Hosoya *et al.*, 1991). De hecho, es importante destacar que ya desde hace dos décadas se está abordando el uso de polisacáridos contra virus como microbicidas, es decir aplicados en las mucosas para intentar prevenir la infección.

Los **carragenanos** son polisacáridos sulfatados extraídos de algas marinas, que generalmente son utilizados como gelificantes en la industria cosmética y alimenticia, aunque algunos de ellos están siendo evaluados como agentes microbicidas (McGowan *et al.*, 2006). Los carragenanos extraídos del alga roja *Gymnogongrus griffithsiae* (Phyllophoraceae, Gigartinales), presentan actividad antiherpética (CE_{50} de 0,5–5,6 $\mu\text{g/mL}$), en células Vero (Bouhlal *et al.*, 2011).

En 2008, se llevó a cabo un estudio randomizado, doble ciego y controlado con placebo, que evaluaba la eficacia y seguridad de Carraguard[®] (PC-515) un carragenano, para la prevención de la infección por VIH en mujeres sudafricanas. El compuesto Carraguard[®] es desarrollado como un gel anticonceptivo vaginal; como ingredientes incluye una mezcla de lambda y kappa carragenanos derivados de algas marinas. Estudios tanto *in vivo* como *in vitro*, sugieren que los carragenanos pueden inhibir el VHS-2 y la infección por VIH (Altini *et al.*, 2010). En el estudio participaron 6.202 mujeres con edades comprendidas desde los 16 años en adelante, sexualmente activas; 3.103 recibieron Carraguard[®] y el resto metilcelulosa como placebo. La duración del estudio fue de dos años, y los efectos adversos se relacionaron más con el uso de un gel vaginal que con el fármaco en cuestión. Este estudio no reveló eficacia en la prevención de la transmisión del VIH. (Skoler-Karpoﬀ *et al.*, 2008). No obstante, el Carraguard[®] sigue siendo desarrollado como microbicida en combinación con otros compuestos. En un estudio en fase II llevado a cabo con esta formulación en dos lugares de Sudafrica, se demostró que su uso no se asociaba con un mayor aumento en la irritación de la mucosa vaginal, cervical o genito-externa que placebo, usando el producto de 3-5 veces por semana, durante el acto sexual, confirmando el resultado de dos estudios previos en fase II de similares características llevados a cabo en Tailandia (Kilmarx *et al.*, 2006, 2008; Altini *et al.*, 2010). Por último, el estudio

mas reciente llevado a cabo por la Universidad de Ciudad del Cabo en Sudáfrica con Carraguard[®], describió por primera vez una menor prevalencia de un microbicida vaginal en el riesgo de padecer infección por papiloma virus frente a placebo (Marais *et al.*, 2011).

En el caso de los **fucoïdanos** extraídos de otro alga marina *Adenocystis utricularis*, de los que ya se conocía su actividad antiherpética, resultaron tener actividad anti-VIH *in vitro*, aunque en este caso el efecto inhibitorio no fue debido a una inactivación del efecto en la partícula viral, sino a un bloqueo en los eventos tempranos a la replicación. Esto hace pensar en la posibilidad de utilizar estos compuestos como posibles candidatos para profilaxis de la infección por VIH (Trincherò *et al.*, 2009).

El acemanano, un manano aislado como inmunomodulador de *Aloe vera* (L.) Burm. F., mostro actividad sinérgica con inhibidores del VIH como AZT (Tilton & Doms, 2010).

Otro compuesto polianiónico, en este caso de síntesis, es un polímero **naftaleno sulfonato** que fue utilizado en un ensayo clínico llamado PRO-2000, que previene tanto la fusión del virus con la célula a nivel de la unión gp120-CD4, como la subsecuente diseminación fuera de la mucosa (Fletcher *et al.*, 2006). Se ha demostrado en estudios *in vivo* que PRO-2000, a 0,5, 2 y 4%, es bien tolerado, aunque aparece un aumento de sangrado intermenstrual a la concentración mas alta comparado con placebo. Este compuesto también presenta actividad anti-VIH *in vitro* (Lacey *et al.*, 2006; Keller *et al.*, 2006).

Los **sulfatos de dextrina** son polianiones que actúan también a nivel del bucle V3 del VIH impidiendo su unión a CD4 através de interacciones electrostáticas entre los grupos sulfatos y los residuos básicos del bucle son bien tolerados pero manifiestan resistencia al VIH-1 salvaje y al tropismo R5 que no poseen apenas residuos básicos., (Moulard *et al.*, 2000).

Para que un antiretroviral sea usado como microbicida, debe ser estrictamente seguro y eficaz.

Actualmente los polisacáridos sulfatados constituyen unos buenos candidatos para ser formulados como agentes anti-VIH vaginales, pues además no son caros.

Los antiretrovirales basados en proteínas recombinantes pueden jugar un papel significativo en la prevención de la transmisión por VIH, pero tienen el inconveniente del alto coste, y la dificultad de su disponibilidad en áreas pobres del África subsahariana. Griffithsin (GRFT), es una proteína de un alga roja, que se ha conseguido producir con buenos rendimientos a partir de la planta *Nicotiana*

benthamiana Domin a la que se transduce como vector un virus mosaico del tabaco. Ésta molécula es activa, con valores de CE_{50} picomolares, uniéndose a las glicoproteínas de la envuelta viral, y es capaz de bloquear la transmisión del VIH célula-célula. Puede ser un firme candidato para ser validado como microbicida antiviral en humanos (O'Keefe *et al.*, 2009).

La tendencia actual es aplicar esos agentes anti-VIH en una base de gel no irritante, que se ha visto que es mejor tolerado por el tracto genital femenino que los surfactantes, los tampones ácidos y los polímeros aniónicos, o incluso unidos los propios microbicidas a agentes que en aplicación tópica regulen a la baja la concentración de citocinas en el tracto vaginal. Este es el caso del monolaureato de *glicerilo* que resultó ser regulador de la concentración de citocinas; en concreto, parece ser que disminuye la concentración de citocinas proinflamatorias, en un modelo *in vivo* en monos y probablemente como consecuencia de esto prevenga la infección por VIH (Li *et al.*, 2009; Roberts *et al.*, 2012).

Las **lectinas** de plantas superiores y de bacterias han recibido especial atención en el campo de los microbicidas es el caso de la cianovirina-N (CV-N). Estas glicoproteínas interaccionan con los glicanos de la envuelta viral (gp120) del VIH, y bloquea la entrada viral en sus células diana. Las lectinas derivadas de las plantas *H. hybrid* y *G. nivalis*, son tetrámeros manosa específicos de 50KDa con selectividad para diversas variedades del VIH-1 y VIH-2 (Balzarini *et al.*, 2006). Mientras que las lectinas de *H. hybrid* tienen especificidad por ambas unidades interna y terminal (α -1,3 o α -1,6), uniones manosil, las de *G. Novalis* las tiene exclusivamente por residuos terminales α -1,6-manosa. Hasta ahora, el monómero de lectina de 8,5KDa de los rizomas de *Urtica dioica* L., ha sido la única lectina de plantas con especificidad por N-acetil-glucosamina, que exhibió pronunciada y consistente actividad anti-VIH.

La **CV-N**, es una proteína de 11KDa derivada de la cianobacteria *Nostoc ellipsosporum*, presenta una gran especificidad para moléculas terminales de manosa α (1-2), y es un candidato a microbicida (Huskens *et al.*, 2008). La inhibición que provoca este compuesto es de tipo irreversible, e implica una unión fuerte con los oligosacáridos de manosa en la glicoproteína gp-120 de la envuelta viral. Ésta unión afecta a la flexibilidad de la gp-120, y se piensa que esto dificulta los cambios conformacionales requeridos para unas correctas interacciones con el receptor de la membrana celular CD-4, y los correceptores CCR5 y CXCR4, los cuales son esenciales para la fusión subsecuente mediada por gp-41. La presencia de glicanos en gp-120 es crucial para que el VIH pueda evadir el sistema inmune; y conformar lo que

se denomina "escudo de glicanos", que permiten el enmascaramiento de las proteínas inmunogénicas. De hecho la mayoría de las proteínas expuestas en el lado extraviral de la envuelta están cubiertas por carbohidratos.

La actividad antiviral de la CV-N y de moléculas similares se basa en un doble mecanismo: por un lado, son capaces de unirse a los glicanos de la envuelta viral, y bloquear la entrada del virus; y por otro lado, la exposición durante largo plazo de tales agentes conduce a una delección progresiva de los sitios de glicosilación en la superficie viral como una respuesta adaptativa a la presión antiviral (Patsalo *et al.*, 2011). Se ha descrito que CV-N inhibe también la transmisión de otros virus con envuelta, inhibe la infección de Ébola y VHS, por unirse a las respectivas glicoproteínas de la envuelta, y la infección de influenza por unión a hemaglutinina. La forma natural de CV-N es inestable con tendencia a formar dímeros, y esto complica su uso clínico. La aplicación clínica más prometedora de CV-N es como microbicida. Se han diseñado variantes de esta molécula que son más estables que la proteína natural, tanto química como térmicamente, manteniendo la estructura nativa con la especificidad del carbohidrato. Esta lectina se expresa en especies de *Lactobacillus* modificados por ingeniería genética y se está considerando la posibilidad de utilizar estas especies, en alimentos como yogures para conseguir aumentar los niveles de esta proteína en diferentes tejidos.

Las lectinas, además, interrumpen el proceso de presentación viral por células presentadoras de antígenos, como las células dendríticas, interfiriendo en los sitios de glicosilación

Actualmente, se está evaluando la eficacia de un compuesto natural llamado **hidroxitirosol**, contenido en el aceite de oliva, un compuesto abundante, barato y fácilmente formulable. Combinaciones de hidroxitirosol con otros fármacos puede dar lugar a un efecto sinérgico, y debido a sus características químicas puede formar parte de excipientes, mejorando la formulación de otros fármacos. Hasta ahora, la acción del hidroxitirosol sobre el ciclo de replicación viral podría afectar a la integración y a la fusión. La IN es una enzima que se incorpora en el virión, por lo que sería una gran candidata para utilizarla como diana de microbicidas, que podrían inhibirla antes de que el virus entre en la célula diana. La fusión implicaría evitar la infección antes de que el virus entre en la célula. Además, hidroxitirosol demuestra en VIH con diferentes tropismos, semejante actividad anti-VIH tanto en líneas celulares (MT-2) como en células mononucleares de sangre periférica, CI_{50} de entre 30 y 90 μM , y una falta de toxicidad hasta 1000 μM , potencia comparada con *tenofovir*, que es de entre 10 y 20 μM (CAPRISA 004). (Abdool Karim *et al.*, 2010)

4.6 Antivirales como microbicidas que bloquean la interacción de gp120-correceptor

El descubrimiento de receptores de quimiocinas como correceptores del virus, la capacidad de las quimiocinas de bloquear la entrada del VIH en la célula, y la observación de que los defectos en la expresión de CCR5 en la célula huésped reducen la infección aguda y la progresión de la enfermedad, proporcionan las bases para el desarrollo de antagonistas de correceptores de VIH como fármacos antirretrovirales. (Este & Telenti, A., 2007). CCR5 es el mas importante correceptor para macrófagos, los cuales predominan durante los primeros estadíos de la transmisión viral (Maeda *et al.*, 2004).

Éstos inhibidores de la entrada bloquean la interacción entre la glicoproteína gp120 de la superficie viral, y los receptores de la membrana plasmática y correceptores de la célula huésped. Uno de los correceptores es el CCR5, una proteína G tipo rodopsina acoplada a proteínas G.

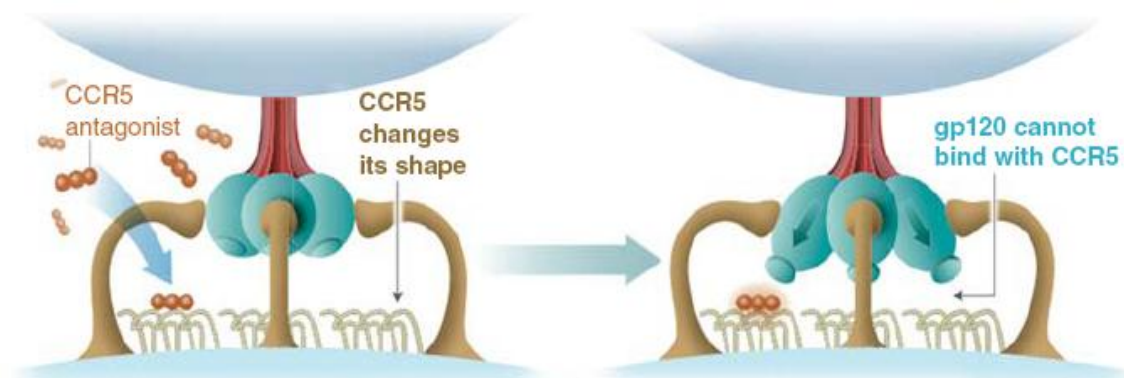


Figura 39. Mecanismo general de actuación de un antagonista del receptor CCR5 por medio de un cambio de configuración en CCR5 que impide la unión con gp-120 y por tanto el ataque del VIH. Shattock, R.J. et al 2012.

La primera clase de inhibidores identificados son los ligandos naturales de CCR5, que incluyen *CCL5 (RANTES)*, *CCL3 (MIP-1 α)* y *CCL4 (MIP-1 β)*. Estas quimiocinas ejercen sus efectos antivirales por bloqueo de la unión gp-120 a CCR5, induciendo la internalización de CCR5 desde la membrana celular, pero tienen actividades agonistas CCR5 potencialmente indeseables. Además, por ser de naturaleza proteica, presentan una pobre biodisponibilidad por vía oral (Wang & Dang, 2008).

Se han desarrollado distintos derivados de *RANTES*, incluyendo *AOP-RANTES*, *NNY-RANTES* y *PSC-RANTES* en un intento de mantener la actividad anti-VIH mientras se

reduce o elimina los efectos agonistas en CCR5; su estructura está representada en la Figura 40. *PSC-RANTES* está en desarrollo como un potencial microbicida para VIH, que exhibe una potente actividad antiviral *in vitro*, inhibiendo la infección del VIH a través de las células de Langerhans, células que forman parte del epitelio vaginal y cruciales en la transmisión del VIH a través del mismo. Estos agentes compiten con gp120 por la unión al correceptor, y por tanto son antagonistas competitivos de la infección por VIH. Un desafío importante a considerar para que estos inhibidores puedan ser utilizados como microbicidas tópicos, es su inactividad en virus con tropismo CXCR4 (Kawamura *et al.*, 2003; Cerini *et al.*, 2008; Cutler *et al.*, 2009).

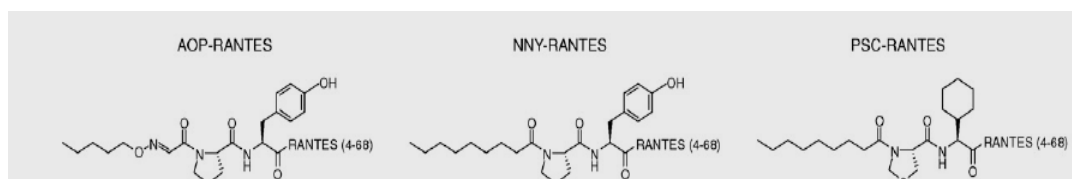


Figura 40. Derivados de RANTES, bloqueantes de la interacción gp120-correceptor. Kawamura *et al.*, 2003

Otra estrategia para inhibir las interacciones gp120-correceptor

Esta inhibición se ha demostrado con un grupo de moléculas de bajo peso molecular que se unen a un bolsillo hidrofóbico en la hélice transmembrana de CCR5, y se cree que ejercen sus efectos antivirales alterando la conformación de los bucles extracelulares que interaccionan con el VIH durante la unión al correceptor. Estos agentes no se unen al mismo sitio de unión que gp120, siendo inhibidores alostéricos más que inhibidores competitivos. Actúan tanto como antagonistas de la actividad del receptor de quimiocinas, como antagonistas de la actividad vía correceptor de la entrada del VIH. No obstante, esto no siempre es así, es decir, la inhibición en la función de la quimiocina no siempre da lugar a la inhibición de la unión CCR5-gp120, ya que se ha visto que la proteína gp120 y las CC-quimiocinas se unen en diferentes regiones de CCR5. Se han diseñado inhibidores que solo interrumpen la unión entre gp120-CCR5 y la entrada viral, sin actuar sobre la activación en la función de CCR5. Se trata de derivados espirodicetopiperazina, de los cuales hablamos en el capítulo de antivirales. El más representativo es *aplaviroc* (GW873140), desarrollado en 2005. *Vicriviroc* (SCH-D, SCH-417690) que está actualmente en estudios clínicos en fase III, es un compuesto de segunda generación, y *maraviroc*, aprobado en 2007 como el único inhibidor CCR5 seguro y eficaz en humanos. Su acción tiene que ver con su capacidad de unirse a los dominios transmembrana de CCR5, y modificar la conformación de su dominio extracelular, inhibiendo de este modo la unión de gp120 a CCR5 (Hu *et al.*, 2010; García-Perez *et al.*, 2011). Impide la unión de la quimiocina

CCL3, también llamada MIP-1 α , CCL4 o MIP-1 β , y CCL5 o RANTES, que como hemos comentado son ligandos naturales de CCR5; de esta manera, el VIH no puede unirse eficazmente a la superficie de las células T evitando de este modo que el virus infecte las células sanas (Este & Telenti, 2007; Permanyer *et al.*, 2010; Tilton & Doms, 2010). Se utiliza como tratamiento de rescate, pero no es activo frente a cepas del VIH con tropismo por el correceptor CXCR4. En la actualidad se están sintetizando dendrímeros de carbosilano polianiónico con maraviroc y se ha comprobado el efecto sinérgico frente a VIH *in vitro* lo que podría permitir el desarrollo de formulaciones con aplicación microbicida tópica (Córdoba *et al.*, 2013). El desarrollo de formulaciones con maraviroc engloba elastómeros de silicona no acuosos que permite la liberación del fármaco mejorando la disponibilidad y la retención en la mucosa lo que permitiría que la aplicación del microbicida fuera independiente del coito. Las características farmacocinéticas y la seguridad de geles a base de maraviroc (0.003-3,3%) se comprobó en monos (Malcon *et al.*, 2013).

Otra actuación antiviral sería utilizar antagonistas o agonistas parciales del correceptor CXCR4, los cuales se ha visto que podrían presentar actividad antiviral. Distintos agentes han sido probados, pero muchos de ellos han resultado ser inactivos, o hepatotóxicos (Permanyer *et al.*, 2010).

4.7. Antivirales como microbicidas que bloquean la fusión

Agentes farmacológicos que impiden la fusión de membranas mediada por gp41, denominados inhibidores de la fusión, fueron los primeros inhibidores de la entrada en ser aprobados para el tratamiento de la infección por VIH. Se encontró que péptidos sintéticos correspondientes a los dominios HR1 y HR2 de gp41 tenían potentes efectos antivirales. Estos agentes fueron inicialmente analizados durante un experimento de mapeo de epítomos diseñados para identificar dianas para el desarrollo de vacunas. Sin embargo, estudios bioquímicos y de cristalización revelaron sus verdaderos mecanismos de acción: prevención en la formación de la seis-hélice por competición en la unión a los dominios HR1 y HR2 en gp41.

Enfuvirtida (T-20) es el primer inhibidor de la fusión aprobado. Se une a la glucoproteína gp41 del VIH-1, impidiendo la fusión del virus con los CD4. Estructuralmente, es un péptido sintético lineal de 36 aminoácidos, con una secuencia idéntica a parte de la región HR2 del gp41 (imita los aminoácidos 127-162 del gp41 del VIH), un dominio clave en la fusión de la membrana (Este & Telenti, 2007). Se están desarrollando un gran número de otros péptidos de nueva generación, los cuales

presentan mejoras farmacodinámicas y eficacias comparadas con *enfuvirtida*. Adicionalmente, ciertos agentes son activos contra algunas cepas del VIH resistentes a *enfuvirtida*, e inhibidores de la fusión, que se unen a diferentes dominios funcionales de gp41 y pueden tener efectos sinérgicos (Pan *et al.*, 2009). Sin embargo, no pueden ser administrados por vía oral, deben ser inyectados. Una alternativa es la generación de D-péptidos inhibidores específicos de la entrada (PIEs), que se unen a gp41, los cuales al contrario que los L-péptidos, no son digeridos por proteasas y tienen el potencial para administrarse vía oral (Tilton & Doms, 2010).

4.8. Antivirales como microbicidas que bloquean la transfección de células dendriíticas a linfocitos a través de gp120- correceptor

A través de un mecanismo llamado transinfección, las DCs transfieren eficazmente el virus una vez que lo han absorbido, a los linfocitos T CD4 donde se produce la replicación viral. Una forma de actuar como anti-VIH sería interferir en este paso. En estos momentos, es una diana preferencial aunque compleja. La interacción VIH-DC esta mediada por los glicanos de gp120 y la lectina tipo C DC-SIGN expresada en DCs. DC-SIGN es un receptor tetramérico, y específicamente reconocido y N-conectado con oligosacáridos de manosa ($\text{Man}_9\text{GlcNac}_2$), a través de múltiples interacciones carbohidrato-proteína calcio-dependientes. Imitar la presentación agrupada de oligomanósidos en la superficie del virus es una estrategia para diseñar nuevos agentes antivirales basados en carbohidratos. Se han preparado y ensayado sistemas manosa multivalentes, basados en proteínas, péptidos, y liposomas, que actúan como inhibidores de la unión DC-SING con gp120, pero ninguno de ellos ha sido suficientemente probado en modelos de transinfección celular. Las **gliconanoparticulas (GNPs)** que son polivalentes y biocompatibles, ofrecen el único potencial para la incorporación simultánea de diferentes ligandos en densidades variables en un sencillo grupo (multivalencia). Se ha descrito actividad a este nivel en células mononucleares de sangre periférica con resultados satisfactorios, donde se demostró una eficacia similar en Mano-GNPs abrigadas con el tetrasacárido lineal $\text{Man}\alpha 1-2 \text{ Man}\alpha 1-2 \text{ Man}\alpha 1-3 \text{ Man}\alpha$, que en GNPs son cadenas más complejas penta y hepta-oligomanosidos. Existe menor o ausencia de actividad en GNPs con cadenas sencillas de mono o disacáridos, relacionando la densidad en oligosacáridos con la actividad (Martínez-Ávila *et al.*, 2009)

4.9 Transcriptasa inversa como diana: ITIANs y ITINNs

En estudios realizados en primates, se ha observado como el virus puede penetrar a través del epitelio columnar y endocervix, un epitelio uniestratificado, y ponerse en contacto con células de Langerhans y células T potencialmente susceptibles a la infección dentro de esa superficie epitelial. La infección se estabiliza entre las 16 y 72 horas, dentro del tejido local de la mucosa, generando un foco de infección localizado, y a continuación comienza la producción y diseminación a través de nódulos linfáticos.

Esta expansión local es crítica para el establecimiento de la infección, y el bloqueo de este escalón podría abortar la infección. Los inhibidores de la IN y TI, cuyo objetivo es la fase de preintegración dentro del ciclo de vida del virus, pueden prevenir el establecimiento de tales focos e inhibir la expansión local, evitando la producción de virus desde el foco de infección (Haase *et al.*, 2011).

Los análogos de nucleósidos inhibidores de la transcriptasa inversa **ITIANs** fueron la primera clase de drogas desarrolladas como terapia anti-VIH (Broder *et al.*, 2010). *Tenofovir*, un análogo de nucleosido inhibidor de la TI, cuyo mecanismo está representado en la Figura 58, fue el primer microbicida aprobado para el tratamiento de la infección por VIH por la FDA en octubre del 2001. Desde entonces, se han preparado numerosas formulaciones para prevenir la transmisión de hombre a mujer de la infección por VIH, tales como geles y anillos intravaginales (Meng *et al.*, 2011).

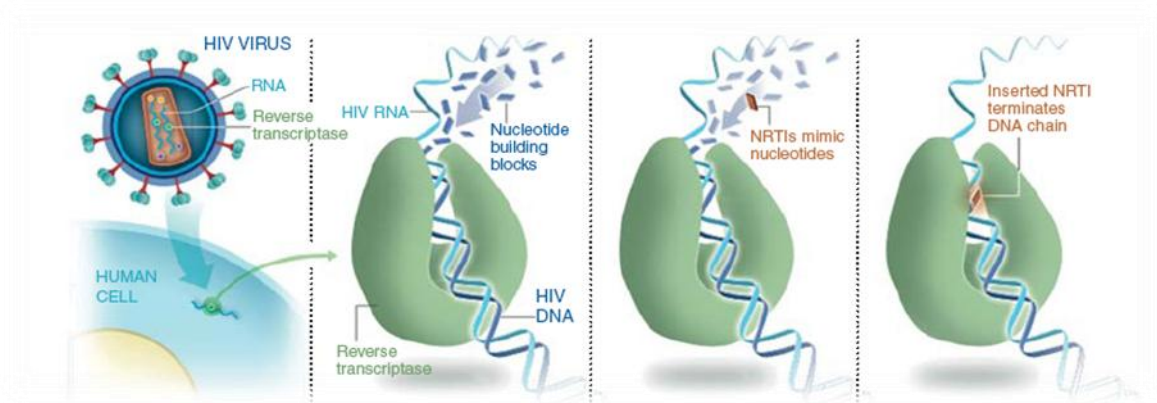


Figura 41. Mecanismo de actuación de un NRTIs como tenofovir. .Shattock, RJ. Et al 2012.

En 2010, el estudio **CAPRISA 004**, reclutó a 900 mujeres sudafricanas, y se les administro un gel a base de *tenofovir* al 1% logrando una reduccion del riesgo de infección por contacto sexual en un 40%, reducción que alcanzó cifras mayores si se cumplían con las pautas de dosificación (Abdool Karim *et al.*, 2010). *Tenofovir* tiene características que le hacen particularmente susceptible para ser utilizado como microbicida; es el único nucleótido inhibidor de transcripasa reversa el cual requiere

solo dos fosforilaciones para activarse, mientras otros nucleótidos inhibidores como AZT, necesita tres fosforilaciones. Además presenta una vida media en tejido muy alta , lo que significa que después de ser aplicado como microbicida puede permanecer durante mucho tiempo en el mismo (Rohan *et al.*, 2010).

En el momento actual, *tenofovir* esta incluido en un estudio fase III llamado **FACTS 001**, donde se evalúa la formulación vaginal de *tenofovir* gel, usando el mismo régimen que CAPRISA 004, con resultados esperados para 2014. Existen otros siete NRTIs aprobados, y ya en uso como medicamentos y pueden ser usadas en combinaciones futuras con *tenofovir* (Parikh *et al.*, 2009; Shattock *et al.*, 2012).

Otro estudio clínico, el **HPTN 052**, demostró que la administración de terapia antirretroviral a individuos seropositivos, pero con sistemas inmunes sanos, el riesgo de contraer la infección se reduce en un 96% (Cohen *et al.*, 2011a). Estos estudios son los primeros en demostrar eficacia en la prevención de la infección por vía sexual.

El segundo tipo de inhibidores de transcriptasa reversa son los no nucleótidos o ITINNs. Su acción se debe a la inhibición no competitiva de la enzima TI. Los ITINNs que están sometidos a evaluación preclínica son *dapivirina*, *HC-781*, *MIV-150* y *MC1220* (Fletcher *et al.*, 2008; Caron *et al.*, 2010). *Dapivirina* es el mas desarrollado en términos clínicos, presentando una gran actividad en modelos preclínicos (Fletcher *et al.*, 2009). Presenta una baja biodisponibilidad por vía oral, y esto podría proporcionar una ventaja como microbicida, porque la aplicación tópica puede conseguir grandes niveles de concentración localizada, con mínima exposición sistémica (Shattock *et al.*, 2012). Está en desarrollo un estudio con *dapivirina* formulado como anillo vaginal para la prevención de VIH, cuyos resultados se obtendrán en 2015 (Devlin, *et al.*, 2013).

Las diariltiazinas constituyen una nueva clase de ITINN que han sido probados como microbicidas tópicos, de ellos el UAMC01398, se elige como cabeza de serie, por su toxicidad celular, su permeabilidad y solubilidad formulándolo sobre un gel acuoso a base de-ciclodextrinas al 0,02% , esto permite un aumento de la permeabilidad del principio activo a través de las células epiteliales con resultados favorables en el caso de ser desarrollado como microbicida (Grammen *et al* 2014).

4.10. Combinaciones

El desarrollo de microbicidas constituye una de las líneas de investigación en VIH que ha ido ganando terreno en estos últimos cinco a diez años. La incorporación de todas y cada una de las moléculas aprobadas para su uso terapéutico por vía oral en estudios de aplicación vaginal resalta aun mas el que esta línea tenga aun mucho

que decir en un futuro. Lo mismo que ocurrió con los antirretrovirales por vía oral, la combinación de moléculas que actúen por diferente mecanismo es un objetivo planteado para lograr mayor efectividad en la aplicación tópica (Herrera *et al.*, 2009).

Hay tres razones principales para combinar los microbicidas: la primera obviamente es incrementar la amplitud de la actividad, la segunda es que la combinación de antirretrovirales puede ser aditiva o sinérgica; de esta manera, bajas concentraciones de droga tienen actividad más potente; y tercera, la combinación de fármacos que interfieren en los diferentes procesos de transmisión del ciclo de vida del virus, proporcionan grandes posibilidades de protección (Shattock *et al.*, 2012).

Al hablar de combinación no nos referimos solo a la mezcla de potentes antirretrovirales sino también a la utilización dentro de la misma fórmula farmacéutica de surfactantes polianiónicos que como hemos referido también han demostrado ser activos que pueden coadyuvar el efecto beneficioso de los antivirales, por ejemplo la combinación de κ -carragenanos y AZT presenta efectos sinérgicos en la reducción de la infección del VIH (Vlieghe *et al.*, 2002)

El estudio **iPrEx** evaluó la eficacia de un gel que combina *emtricitabina* y *tenofovir*, protegiendo a un 44% en hombres que tienen sexo con hombres (Grant *et al.*, 2010). Estudios punteros usando modelos celulares y tejidos, han confirmado que la combinación de *tenofovir* y *davirapina* ofrecen mejores resultados en cuanto a actividad que cada uno individualmente, tanto en cepas resistentes como no resistentes (Shader *et al.*, 2007; Herrera *et al.*, 2009). Una combinación de los dos antirretrovirales que poseen diferente hidrofilia pueden ser estables formulados en el interior de un anillo vaginal de poliuretano, liberando sostenidamente durante 30 días cada uno de los agentes antirretrovirales (Johnson *et al.*, 2010).

Otra combinación que puede dar lugar a un sinergismo potente, inhibiendo la fusión VIH-1 mediada célula a célula, y la infección por X4 y R5, así como las resistencias adquiridas por VIH a *enfuvirtida*, es la combinación de *enfuvirtida*, inhibidor de la fusión con otro como es *sifuvirtida*. Esta combinación puede mejorar su eficacia y perfil de resistencia, conllevando a una reducción en la dosis y en la frecuencia de uso de la droga (Pan *et al.*, 2009)

4.11. Factores importantes para el desarrollo de un microbicida

Existen dos puntos críticos en la investigación y el desarrollo de nuevos microbicidas: formulación y eficacia. La formulación será crítica para que el fármaco alcance el sitio de infección en concentraciones eficaces, y la eficacia tiene que ser

total, de manera que evite el contagio totalmente, ya que teóricamente el escape de unos pocos virus puede dar lugar a infección.

Una de las variables que mas afectan a la aceptación de un microbicida como gel , es su concentración en el lumen vaginal una vez se ha aplicado. Los geles acuosos son todavía la forma de dosificación mas popular para la aplicación de microbicidas. Los geles tienen una retención limitada en el tracto vaginal (horas) por lo que están pensados para una protección inmediata, ellos deberán asegurar casi instantáneamente la disponibilidad del microbicida en el tejido subepitelial del tracto cervicovaginal. Esto requiere una gran concentración de microbicida vaginal, que es la fuerza conductora para la penetración en el tejido subyacente. La presencia de fluido vaginal y seminal en el tracto cervicovaginal, sin embargo, puede ocasionar la disolución (en el caso de una suspensión en gel) o precipitación, y de este modo afectando a la disponibilidad después de la aplicación (Browsers *et al.*, 2011). Por tanto, es importante evaluar la composición de la forma de dosificación y características de los vehículos, así como la solubilidad de los agentes anti-VIH en los mismos y en los fluidos seminal y vaginal.

Se están estudiando nanopartículas poliméricas como sistemas de liberación microbicidas para antivirales. Estas nanopartículas están compuestas por polímeros naturales y sintéticos, entre ellos podemos citar quitosano, que resulta atractivo debido a sus propiedades fisicoquímicas y biológicas (Zhang & Kawakami, 2010). Chitosan es un aminopolisacárido lineal soluble en agua, cuya estructura es 2-amino- 2- deoxi- β - D- glucano combinado con ligandos glicosídicos. Presenta muchas ventajas en el desarrollo de nanopartículas, que incluyen biocompatibilidad, biodegradabilidad, y baja inmunogenicidad, y es obtenido por desacetilación de quitina, un polisacárido natural y abundante con una estructura simple β -(1 \rightarrow 4) glucano compuesto de unidades de 2-acetamido-2-deoxi- D-glucopiranosas. El quitosano se encuentra como constituyente mayoritario en conchas de artrópodos tales como cangrejos, camarones, langosta, insectos, y también es producido extracelularmente por hongos y algunas algas marrones. quitina y quitosano son conocidos por presentar actividad antitumoral, antibacteriana, hipocolesterolemizante, antihipertensivo y anti-VIH (Artan *et al.*, 2010).

La gran densidad de carga positiva, le confiere además propiedades mucoadhesivas, ya que estos tipos de sistemas presentan una clara afinidad por la asociación de macromoléculas cargadas negativamente, como la mucina presente en la superficie mucosa; esto le convierte en un candidato ideal para ser aplicado en las mucosas. (Meng *et al.*, 2011).

Los estudios de actividad farmacológica de *tenofovir in vitro* y *ex vivo* demuestran que es efectivo como posible microbicida anti VIH-1 para la prevención de la infección (Anderson *et al.*, 2010; Rohan *et al.*, 2010). *Tenofovir* es una pequeña molécula soluble en agua, la cual contiene un grupo fosfato y está cargada negativamente en solución de sosa. Puede por tanto interactuar con chitosan a través de fuerzas electrostáticas, en resumen, con nanopartículas de chitosan se puede crear un sistema de liberación controlada, seguro y bioadhesivo en la mucosa (Meng *et al.*, 2011). Están siendo desarrolladas nuevas tecnologías, por ejemplo la forma de dosificación a través de un film delgado para aplicarlo sobre la mucosa vaginal (Romano *et al.*, 2008).

5. ANTIVIRALES DE ORIGEN NATURAL

Las investigaciones sobre actividad antiviral con materiales vegetales comienzan hace más de veinte años. Las plantas son sometidas a extracciones con disolventes de polaridad creciente y son los extractos totales los que inicialmente se prueban en cultivos de células con bacterias de virus ADN y ARN. Revisaremos en primer lugar la actividad sobre virus que no son VIH y a continuación reseñaremos los compuestos aislados a partir de plantas con actividad sobre VIH, remarcando especialmente aquellos que se tiene conocimiento de parte de su mecanismo de acción. Dado que los principios activos investigados en la presente Tesis son polisacáridos, se reseñarán en capítulo aparte la revisión bibliográfica de las actividades antivirales de estas macromoléculas.

Los resultados más llamativos corresponden a actividades sobre el virus del herpes, en ensayos *in vitro* y en ocasiones en modelos animales de infección con este virus. Este tipo de búsquedas se realizan en diferentes países y son consecuencia de estudios en colaboración de fitoquímicos con virologos. Aparecen publicaciones desde el año 1993 de actividad sobre diferentes extractos de plantas de Indonesia, Argentina, Australia, diferentes países de África, China, Japón, como muestra citaremos la publicación más reciente que corresponde a la validación científica de la medicina tradicional india basada en plantas, Vimalanathan *et al.* (2009) estudiaron 30 plantas derivadas de 22 familias y su actividad antiviral. Muchos extractos resultaron ser activos frente **VHS, coronavirus, e influenza**. En este mismo estudio, se describió también una menor actividad de estos extractos metanólicos en virus sin membrana como son polio, calicivirus y rinovirus, aunque sí destacaba una actividad anti-VHS y anti-CMV a una concentración menor de 0,4 µg/mL. Las plantas más activas resultaron ser *Clerodendrum inerme* (L.) Gaertn (Verbenaceae), *Evolvulus alsinoides* L.

(Convulvalaceae), *Leucas aspera* Spr. (Lamiaceae), *Sphaeranthus indicus* L. (Asteraceae), y *Gymnema sylvestre* R. Br. y *Pergularia daemia* (Fosskal) Chiov., de la familia Asclepidaceae. También citaremos que algunas veces las pruebas sobre herpes se completan con estudios en ratones, como por ejemplo en el caso del extracto etanólico del árbol del Té, *Melaleuca leucadendron* L. que logra disminuir las lesiones cutáneas en los animales.

El **aceite esencial** destilado de la *Artemisia arborescens* L. juega un papel importante como antiviral frente al **VHS-1**, actuando intracelularmente (Lai *et al.*, 2007). Se están investigando las formas farmacéuticas más idóneas para la administración oral del preparado. También el aceite esencial de la especie turca *Satureja thymbra* L. inhibe el crecimiento del **VHS-1**, con una CI_{50} de 220 $\mu\text{g/mL}$. (Loizzo *et al.*, 2008)

Entre los principios activos aislados y elucidados de los extractos activos de plantas se encuentran polifenoles tales como flavonoides, ácidos fenilpropánicos, taninos, naftoquinonas y lignanos, también se encuentran alcaloides y saponinas triterpénicas.

En general, se cree que la actividad antiviral de los **taninos y demás polifenoles** se debe a su capacidad para formar fuertes complejos con macromoléculas, asociándose a proteínas de las partículas virales, o a proteínas de la superficie de la célula huésped. Esto da lugar a una disminución de la adsorción del virus, impidiendo su penetración en la célula.

La especie *Markahamia lutea* Seemann ex Baillorr, de cuyas raíces se aislaron tres heterósidos fenilpropánicos llamados luteósido A, B, y C, junto con el verbacósido e isoverbacósido, presentó una actividad antiviral *in vitro* frente al **virus respiratorio sincitial** (Kernan *et al.*, 1998). Los cinco compuestos aislados igualmente presentaron actividad, con unos valores de concentración inhibitoria 50 (CI_{50}) entre 0,62-5 $\mu\text{g/mL}$.

Se han aislado del extracto metanólico de la sumidad de *Justicia procumbens* L. var. *leucantha* (Acanthaceae), diez **lignanos** con propiedades antivirales (Asano *et al.*, 1996). Esta planta es utilizada en la medicina tradicional china para afecciones laríngeas. De ellos, la justicina A y B, difilina, difilina-apiósido y difilina-apiósido-5-acetato presentaron una marcada actividad antiviral frente a **VSV**, además de una baja citotoxicidad en los cultivos de células utilizados.

De la especie *Rhinacanthus nasutus* (L.) Kurz (Acanthaceae), se han aislado dos **naftoquinonas**, rinacantina C y rinacantina D, con actividad significativa frente a **CMV** (Sendl *et al.*, 1996). Un año después, Kernan *et al.* (1997), aíslan de la parte

aérea de esta misma planta, dos nuevas naftoquinonas, rinacantina E y rinacantina F, con una significativa actividad antiviral frente al virus influenza tipo A.

Del extracto clorofórmico de *Eriobotrya japonica* L. (Rosaceae), se extraen y prueban cuatro **compuestos triterpénicos** junto con tres derivados del ácido ursólico, frente a **rinovirus** (de Tomassi *et al.*, 1992). Únicamente resultó activo un compuesto triterpénico, el ácido 3-O-transcafeoilorméntico

Dos **saponinas** de núcleo triterpénico, la soyasaponina I y II, se han ensayado frente a **VHS-1**, demostrándose que la soyasaponina más potente resultó ser la soyasaponina II (Nakashima *et al.*, 1989; Hayashi *et al.*, 1997). Además, se ha encontrado que inhiben la replicación de **CMV, virus influenza y VIH-1**. Estas saponinas han sido aisladas de la soja.

Tres saikosaponinas aisladas de *Bupleurum rigidum* y de *Scrophularia scorodonia* demostraron actividad en VSV y VHS-1 (Bermejo *et al.*, 2002)

La berberina es un **alcaloide** isoquinoleínico extraído de los rizomas de *Coptis chinensis* L., planta medicinal con un gran valor en los países asiáticos que ya en la pasada década se describió como antitumoral, hipolipemiente, antiinflamatorio y antiinfeccioso. Recientemente, se ha demostrado que también es activo frente a **herpes**, llegando a describir que su mecanismo de acción esta relacionado con la inhibición de la síntesis del ADN viral (Chin *et al.*, 2010).

En el caso del VIH, se han identificado compuestos y extractos de origen vegetal como inhibidores de las diferentes fases del ciclo de la replicación del virus. Nos centraremos en los principios activos aislados ya que nos permiten identificar posibles dianas de actuación del compuesto. Se puede hacer una clasificación de los inhibidores naturales del ciclo biológico del VIH, según actúen en la entrada, en la transcripción inversa, en el transporte del ARNm al citoplasma, a nivel de la PR, y en el procesamiento y liberación de las partículas virales.

A nivel de la **adsorción** del virus, actúan alcaloides crómicos (shumannicina), alcaloides isoquinoleínicos (michelaminas), polisacáridos sulfatados, flavonoides, cumarinas (glicocumarinas, licopiranocumarinas), ácidos fenólicos (derivados del ácido caféico, gálico y catéquico), taninos, y triterpenos (glicirricina y análogos, soyasaponina y análogos) (Vlietnick *et al.*, 1998).

En cuanto a **inhibidores de la entrada**, se han descrito muchos compuestos. Algunos de ellos presentan una selectividad bastante baja, por lo que han sido propuestos como agentes tópicos para evitar la entrada del virus en el organismo. Sin embargo, la interacción entre la gp120 del VIH y la molécula CD4 es bastante específica, y la región de unión de la gp20 se conserva en comparación con el resto

de la proteína (Shioda *et al.*, 1991). Ejemplos de estos compuestos, son las **isocumarinas** aisladas de la planta medicinal china *Ardisia japonica* (Thunb.) Bl, bergenina y norbergenina, que inhiben la unión de gp120 con el receptor CD4 en la línea celular C8166 (CI₅₀ de 40 y 20 µg/mL, respectivamente) (Piacente *et al.*, 1996). A este nivel también actúan las **catequinas** presentes en el té (Zhao *et al.*, 2012)

También algunos aceites esenciales y sus componentes (metil n-nonilcetona, aldehído láurico y caprílico) inhiben la entrada del VIH en las células, por interferir con la envuelta del virus, como el aceite esencial obtenido por destilación de la planta *Houttunya cordata* Thunb. (Hayashi *et al.*, 1995). Este aceite esencial también inhibe la entrada de otros virus con envuelta, como el virus de la gripe y el VHS-1.

El ácido 3-hidroxi-láurico, aislado de *Hypericum perforatum* L. presenta actividad anti-VIH (Maury *et al.*, 2009). El sinapil diangelato y el heteroplexisolido aislados de *Heteroplexis microcephala* Y. L. inhiben la replicación viral (Xiao *et al.*, 2010).

A nivel de la fusión, actúan las **lectinas** (específicas para manosa y N-acetilglucosamina) Las lectinas manosa específica han sido aisladas de una gran variedad de plantas como *Galanthus nivalis* L., *Hipeastrum irbid* L., *Narcissus pseudonarcissus* L., *Listera ovata* (L.) R. Br., *Cymbidium irbid* L., *Epipactis helleborine* (L.) CRANTE, *Vigna sesquipedalis* (L.) Verdc. (Balzarini *et al.*, 1991; Lopez *et al.*, 2003; Wong *et al.*, 2003). Todas ellas actúan a través de la interacción con los receptores de la entrada, probablemente a nivel de DC-SIGN. Las lectinas α -(1-3)-D-manosa y α -(1-6)-D-manosa de *G.nivalis*, *H. hybrid*, *N. pseudonarcissus*, y *L. ovata* inhiben la infección de células MT4 por VIH-1 y VIH-2, a concentraciones comparables al sulfato de dextrano DS-5000, utilizado como sustancia de referencia (CI₅₀: 0,2-0,6 g/mL). Sin embargo, las lectinas derivadas de plantas no inhiben la replicación de otros virus con envuelta, excepto **CMV**. Inhiben también la formación de sincitios, pero no la unión del VIH con células CD4. Los datos sugieren que las lectinas interfieren no sólo con la presentación vía DC-SIGN, sino también en otro evento temprano en el ciclo de replicación del VIH (Balzarini *et al.*, 2006)

En el caso de las lectinas derivadas de *G. nivalis*, e *H. hybrid*, se observó que cepas del VIH resistentes, mostraban un cambio en diversos aminoácidos que formaban parte de gp120, pero no gp41 (De Clerck, 2004). La mayoría de estos cambios aminoacídicos ocurrieron en los sitios de N-glicosilación, y la intensidad en las resistencias estaba relacionada con el número de mutaciones en los sitios de glicosilación, o se produjeron resistencias cruzadas con otros inhibidores de la entrada del virus como sulfato de dextrano, AMD-3100, o enfuvirtida. Las lectinas derivadas de

plantas, la cianovirina CV-N entre otras, presentan un único y novedoso mecanismo para evadir la resistencia del VIH, y están dotadas de una serie de propiedades que les hace idóneos para utilizarse como microbicidas para la prevención de la transmisión sexual de VIH, en forma de geles como ya se ha comentado anteriormente.

Otros compuestos inhibidores del VIH son los **compuestos triterpénicos** ingenol 3,5,20-triacetato (CI_{50} de 0,07 μM), y el 13-hidroxiingenol-3-(2,3-dimetilbutanoato)-13-dodecanoato (CI_{50} entre 0,051–0,65 μM) aislados de *Euphorbia kansui* SLLiou ex SBHo (Fujiwara *et al.*, 1996)(Warrilow *et al.*, 2006). ; SJ23B, un diterpeno jatrofano aislado de *Euphorbia hiberna* L. (Bedoya *et al.*, 2009); glicirrizina (CI_{50} de 0,075–0,6 μM) aislada de *Glycyrrhiza glabra* L. (Zhao *et al.*, 2006); glicósidos triterpénicos (CI_{50} entre 5–30 μM) aislados de *Telenata ananas* spp (Hegde *et al.*, 2002); y el 3 α -metoxiserrat-14-en-21b-ol aislado de *Picea jezoensis* Carr (Tanaka *et al.*, 2009). Del rizoma de *Cimicifuga racemosa* se aísla un triterpeno tetracíclico, la acteina junto con otros 82 saponinas triterpénicas y esteroidicas, de todos estos compuestos el más activo es la propia acteina (Sakurai *et al.*, 2004). Todos estos compuestos presentan una actividad bloqueante del correceptor CCR5, actúan por tanto inhibiendo la entrada viral.

El ácido betulínico (figura 59), un triterpeno extraído de *Ziziphus jujuba* L. H. Karst por Kundu *et al.*, en 1989 y de la raíz de *Z. cambodiana* Pierre por Suksamrarn *et al.*, en 2006 mostraron actividad frente a la replicación del VIH en los linfocitos H9 en la unión de gp41 a los correceptores, con una IC_{50} de 1,4 μM y con un índice terapéutico (IT) de 9,3 nM/L. Se han desarrollado derivados semisintéticos del ácido betulínico RPR103611 (figura 59) y IC9564, con cadenas laterales en la posición 28 que inhiben la entrada del VIH-1 en las células T4 (Aiken & Chen, 2005).

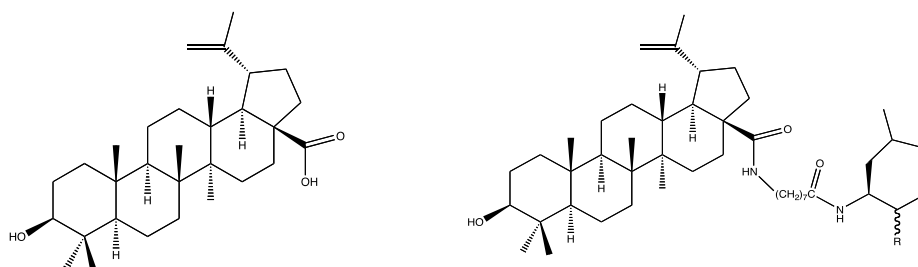


Figura 42. Ácido betulínico y derivado betulínico RPR103611

Otros triterpenos, son el ácido platánico, lupeol, y la betulina que también presentaron actividad antiviral en particular con respecto al VIH, virus del herpes simple y virus de Epstein–Barr (Flekhter *et al*, 2004)

La lactona diterpenica andrografolido, extraída de *Andrographis paniculata* Burm. f. Wall. ex Nees, no presentaba actividad contra el VIH–1 a concentraciones de hasta 142 μM . Sin embargo, el succinato de dehidroandrografolido inhibe la fusión celular, y la unión del VIH–1 a las células H9 en concentraciones subtóxicas. El promedio de concentración inhibitoria media (CIM) de este compuesto fue de 4,6 μM y la concentración tóxica media (CTM) fue de 250 μM (Chen *et al.*, 2003).

Análisis fitoquímicos de los frutos de *Annona glabra* L., identifican dos nuevos diterpenoides kauranos, annoglabasina A y annoglabasina B, junto con once derivados de kaurano conocidos. Dos de ellos presentaron una inhibición significativa de la TI en linfocitos H9 (Chang *et al.*, 1998).

Moléculas descritas con actividad anti–VIH **son los polifenoles**. La baicaleina (IC_{50} de 72 μM), flavonoide aislado de *Scutellaria baicalensis* Georgi, es uno de los compuestos naturales con actividad inhibidora sobre la unión del VIH a los correceptores CCR5 y CXCR4 (Cruchaga *et al*, 2007). Otros compuestos que también inhiben la unión a los correceptores son la miricetina (IC_{50} de 45 μM) aislada de *Alnus firma* Sieb & Zucc (Yu *et al*, 2007b) y una flavan–chalcona (IC_{50} de 18.05 μM) aislada de *Sarcandra hainanensis* Pei Swamy et Bailey. (Cao *et al*, 2009)

Estudios recientes ponen de manifiesto que los receptores de quimiocinas, CCR2b, CCR3, CCR5, CXCR1, CXCR2 y CXCR4, sirven como correceptores de la entrada para el VIH. Los compuestos polifenólicos y flavonoides presentan sus efectos anti-VIH interfiriendo a nivel de correceptores. Se ha demostrado que constituyentes de este tipo (proantocianidinas), del extracto de semillas de uva disminuyen la expresión de los correceptores de la entrada para el VIH, CCR2b, CCR3 and CCR5 de una



Figura 43. *Hamamelis virginiana* L.
. www. Koehler's medicinal plants

manera dosis dependiente (Nair *et al.*, 2002). Los elagitaninos aislados de *T. lignosa* inhiben la entrada del VIH (IC_{50} de 37,15 $\mu\text{g/mL}$), mediante la internalización de los receptores CD4 y CXCR4 (Bedoya *et al.*, 2010).

A partir de un extracto hidroalcohólico de la corteza y hojas de *Hamamelis virginiana* L. se obtienen por ultrafiltración los principales componentes químicos responsables de esta actividad, **los taninos** gálicos. (Erdelmeier *et al.*, 1996). Su acción se basa fundamentalmente en la reacción con las glicoproteínas de la envuelta, o bien con los receptores celulares de estas. Sin embargo éste mecanismo nunca alcanza una gran efectividad, por tanto actuarían inhibiendo otro paso, como ocurre con el galato de epicatequina que actúa mediante la interacción con receptores de quimiocinas (Nair *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2012). Este tanino ha sido aislado de plantas como la *Camelia sinensis* L. y *Detarium microcarpum* Guil. & Perr.

El galato de epicatequina interacciona con receptores de quimiocinas que además de actuar a nivel de entrada también inhibe la TI (Nance *et al.*, 2009; Williamson *et al.*, 2006). Recordemos también, la actividad de los elagitaninos aislados del extracto acuoso de *Terminalia triflora* (Griss.) Lillo (Combretaceae), En general, la acción de los taninos se basa fundamentalmente en la interacción con la glicoproteínas virales de la envuelta o con sus receptores, aunque también se ha relacionado con otros mecanismos, como la inhibición en

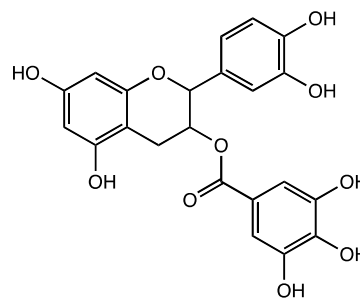


Figura 44. Galato de epicatequina

otro paso dentro del ciclo de infección viral, éste el caso del galato de epicatequina mencionado anteriormente. Otros taninos que han demostrado inhibir la formación de la proteína gp41, son los aislados de *Prunella vulgaris* (Liu, *et al.*, 2002 ; Lu *et al.*, 2004), y además del ácido chebulágico, punicalina y punicalagina aislados de *Terminalia chebula* Retz, que han mostrado actuar de igual manera sobre la gp41 (Nance *et al.*, 2009; Cruchaga *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2007B; Williamson *et al.*, 2006; Lu *et al.*, 2004; Ahn *et al.*, 2002; Nair *et al.*, 2002; Nonaka *et al.*, 1990).

Sin embargo, el mecanismo de acción antiviral de los taninos sigue sin ser aclarado del todo, ya que se han identificado además, taninos con actividad sobre la RT, PR, y con actividad frente a otros virus, como el coronavirus causante del síndrome respiratorio agudo (Yi *et al.*, 2004; Martino *et al.*, 2004; Ahn *et al.*, 2004).

Los alcaloides son compuestos de naturaleza básica, algunos de los cuales presentan actividad anti-VIH; así podemos mencionar la isobatzelina E (figura 61) y los alcaloides policíclicos crambescidina 826 y dehidrocrambina A, que son inhibidores

de la fusión. Otros alcaloides, de tipo cromona y aislados de plantas de la familia Rubiaceae como *Schumanniphyton magnificum* (K. Schum.) Harms, mostraron

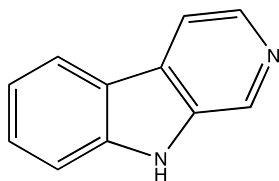


Figura 45. β -Carbolina

actividad anti-VIH al ser inhibidores a nivel de la entrada viral (Chang *et al.*, 2003; Chang *et al.*, 2002).

Otros ejemplos de alcaloides activos son la β -carbolina, Figura 45, (IC_{50} de 10.7 μ M) aislada de *Symplocos setchuensis* Brand (Cos *et al.*, 2008; Ishida *et al.*, 2001), la isobatzellina E, batzellina D, batzellina C, isobatzellina C y makaluvamina D (IC_{50} de 0,25 μ M) aislados de la esponja marina *Zyzzya fuliginosa* (Sangma *et al.*, 2005), licojapodina A (IC_{50} de 85 μ g/mL) aislada de *Lycopodium japonicum* Thunb (He *et al.*, 2009) y harringtonina (CI_{50} de 0.224 μ M) y resobeno (CI_{50} de 30 μ M) aisladas de *Cephalotaxus hainanensis* H. L. Li (Pochet *et al.*, 1990; Halliday *et al.*, 1996).

Como hemos mencionado anteriormente los elagitaninos son también **inhibidores de la proteasa**. La PR es una enzima viral encargada de procesar las proteínas virales, e incluso de autoprocesarse. Todas las proteínas virales son procesadas antes de que puedan realizar su función, la gran parte por acción de la PR viral. Son potentes inhibidores de la PR, los **elagitaninos** que se presentan unidos a las posiciones O-3 y O-6 de un azúcar, normalmente la glucosa, como el cameliatanino aislado del té (Xu *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, 2012).

Como inhibidores de la PR también tenemos a **saponinas** (ácido ursólico y maslínico), y cumarinas. El extracto metanólico de *G. japonicum* (Rosaceae), actúa inhibiendo la PR en el ciclo de replicación del VIH-1 (Xu *et al.*, 1996). Al someter al extracto a un fraccionamiento, se detectan siete ácidos triterpénicos, de los cuales únicamente dos, el ácido ursólico y el maslínico, resultaron activos. Compuestos como 4-hidroxycumarinas 3-sustituidas, además de la actividad anti-PR, presentan también actividad anti-IN (Mazumder *et al.*, 1996).



Figura 46. *Rhus succedanea*.
www.botanical.com

Dentro de la familia de inhibidores de VIH de origen natural de estructura **cumarínica**, probablemente los más prometedores sean los calanólidos, que son piranocumarinas. El mas interesante es el (+) calanólido A, que es mas activo que sus derivados sintéticos. Su actividad no se limita al VIH, sino que posee actividad frente a CMV, uno de los virus responsables de las enfermedades oportunistas que se dan durante la enfermedad del VIH (Xu *et al.*, 2000). Es el primer análogo no nucleósido con capacidad de inhibir VIH y CMV. En ensayos clínicos realizados con esta cumarina, es importante destacar los efectos adversos poco importantes en pacientes sanos seronegativos. (Einzhamer *et al.*, 2002). Por último, señalar que además de su actividad frente a VIH y CMV, ha demostrado actividad frente a cepas resistentes y no resistentes de *Mycobacterium tuberculosis* (Xu *et al.*, 2004). Su actividad anti-VIH se complementa, por tanto, con su actividad sobre dos de las infecciones oportunistas mas frecuentes en el paciente con SIDA.

También se han encontrado compuestos de origen natural que **inhiben la transcriptasa inversa (TI)**. La TI o retrotranscriptasa (RT), es la enzima viral que transcribe el ARN viral en el ADN proviral. Se han extraído de las especies *Rhus succedanea* L. (Anacardiaceae) (Figura 46) y *Garcinia multiflora* Champ. (*Clusiaceae*), once biflavonoides como anti-VIH, a nivel de la RT (Lin *et.al.*, 1999). Los compuestos más interesantes resultaron ser la amentoflavona (Figura 47), agastiflavona, moreloflavona, ribustaflavona y hinokiflavona, siendo éstos dos últimos los más activos

Dentro de los inhibidores de la TI de origen protéico, encontramos las **lectinas**. Su principal papel está en los fenómenos de reconocimiento, tanto a nivel molecular como celular. Por ejemplo, algunas bacterias utilizan lectinas para acoplarse a las células del organismo hospedador durante la infección. Se

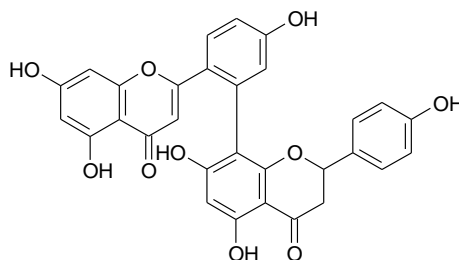


Figura 47 Amentoflavona

describen lectinas aisladas de *Phaseolus vulgaris* L. (judía), *Momordica charantia* L. (melón amargo), *Ricinus communis* L. (ricino) y *Agaricus bisporus* (J. E. Lange) Imbach, con efectos inhibidores sobre TI (Wang & Ng, 2001).

La TI va a ser también inhibida por **terpenos**, **polisacáridos**, **alcaloides** (benzofenantridinas, protoberberinas, isoquinolinas y quinolinas), **cumarinas** (calanolidos y análogos), **taninos**, y **otros compuestos polifenólicos**. (Kumar, 2012)

De otra especie del género *Garcinia*, *Garcinia speciosa* Wall., se han obtenido los **triterpenos** garciosaterpenos A y C, y garciosafenona A inhibidores de este

enzima (Concentración Eficaz 50 CE_{50} 5,8 mg/mL) (Rukachaisirikul *et al.*, 2003). El ácido 16 β ,17-dihidroxi-*ent*-kuran-17-oico, aislado de los frutos de *Annona squamosa* L. (Annoaceae), es activo frente a la replicación del VIH en linfocitos H9, con una CE_{50} de 0,8 μ g/mL (Wu *et al.*, 1996). Otra especie del mismo género. la *Annoa glabra* L., también ha sido objeto de estudio (Chang *et al.*, 1998). Así la annoglasbina B, presenta cierta actividad en la replicación del VIH en linfocitos T6, mientras que la annoglasbina B actúa a nivel de la RT. Por otra parte, se han aislado del extracto orgánico de *Hopea malibato* Foxw (*Dipterocarpaceae*), dos oligoestilbenos con actividad moderada sobre la TI del VIH, el dibalanocarpol y el balanocarpol (Dai *et al.*, 1998).

Dos alcaloides quinolínicos (buchapina 1 y 2), y tres furoquinolínicos (roxiaminas A, B y C) aislados de la especie *Euodia roxburgiana* Benth., también presentan actividad anti-RT en una línea celular de linfoblastoma humano CEM-SS (Mc Cormick *et al.*, 1996). Otro compuesto polifenólico que inhibe las RT es el gossipol, un aldehído aislado del algodón (Vlietinck *et al.*, 1998).

Recientemente, se han sintetizado derivados de esta molécula que presentan actividad a nivel de la fusión del VIH con la célula huésped (An *et al.*, 2012)

Cumarinas, como el calanólido A (Figura 48), aislado de *Calophyllum lanigerum* Miq, resultó ser muy activo contra la RT del VIH interfiriendo con la unión dNTP actuando de manera sinérgica, lo que nos haría suponer que era diferente a la clase general de

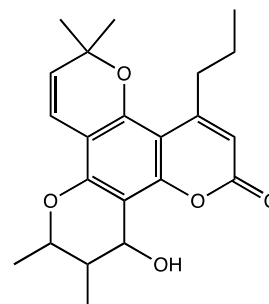


Figura 48. (+)-Calanólido A

nucleósidos inhibidores de la RT. Es el primer análogo no nucleosídico con capacidad para inhibir estos virus, así como también bacterias como el *Mycobacterium tuberculosis*, que son habituales en pacientes con el sistema inmunológico afectado, como ocurre en las personas con SIDA (Ibañez, 2007; Kostova, 2006; Xu *et al.*, 2004; Eiznhamer *et al.*, 2002). Dentro de las cumarinas, destacan derivados semisintéticos del (+)-calanólido A, como el 10-clorometil-11-demetil-12-oxo-calanólido A, que ha presentado actividad *in vivo* frente a especies mutantes del VIH-1 (Xue *et al.*, 2010)

Otros compuestos que inhiben la RT son las **4-fenilcumarinas** (Figura 49) aisladas de *Marila pluricostata* Standl. & L. O. Williams, con un IC_{50} de 11,2 μ M, el soulatrólido (IC_{50} de 0,34 μ M) aislado de *Calophyllum teysmannii* sp, el cordatólido A y el cordatólido B con un IC_{50} de 12,3 μ M y de 19.0 μ M respectivamente, aislados de *Calophyllum cordato-oblongum* Thwaites (Lameira *et al.*, 2006; Bedoya *et al.*, 2005; Dharmaratne *et al.*, 2002).

Los **taninos** también juegan un papel importante en la inhibición de la RT y en sus mutaciones. Cabe mencionar la epigallocatequina-(4 β 8,2 β O-7)-epicatequina (IC₅₀ de 70 μ g/mL) aislada de *Cupressus sempervirens* L (Cos *et al*, 2008), la corilagina (IC₅₀ entre 1,8–14.6 μ M) aislada de *Phyllanthus* spp (Notka *et al*, 2004), la 1,2,3,6-tetragalolilglucopiranososa (IC₅₀ de 0.040 μ M) aislada de *Juglans mandshurica* Maxim (Tillekeratne *et al*, 2001) y la geraniina (IC₅₀ entre 1,8–14.6 μ M) aislada de *Phyllanthus amarus* (Notka *et al*,

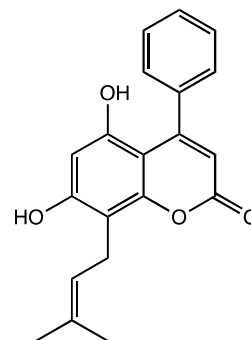


Figura 49. 4-fenilcumarina

2004). La actividad de los taninos y su mecanismo de acción sólo se ha demostrado en ensayos *in vitro* (Notka *et al*, 2004; Min *et al*, 2002; Tillekeratne *et al*, 2001). Se ha descrito actividad anti-VIH en extractos acuosos procedentes de *Terminalia triflora*, y parece ser que la actividad reside en dos **elagitaninos** presentes en la hojas de esta planta, punicalina y 2-O-galloil punicalina (Martino *et al.*, 2004). Estos compuestos inhiben la retrotranscriptasa

De **organismos marinos** se han aislado gran cantidad de compuestos con propiedades anti-VIH, entre ellos florotaninos como el 8,4-dieckol extraído del alga *Ecklonia cava* (IC₅₀ de 5,31 μ M)(Ahn *et al.*, 2004). Este tipo de taninos inhiben la RT y PR del VIH. Las esponjas, son también una buena fuente de compuestos con actividad anti-VIH; de ellas destaca la ilimaquinona aislada de *Smenospongia* spp con actividad inhibidora específica de la ARNasa asociada a la RT del VIH, también aislados de *Dysidea cinérea* se encuentran el deavarol y derivados de avarona (IC₅₀ entre 6–18 μ M) (Tziveleka *et al*, 2003) y la taurospongina A (IC₅₀ entre 6,5–7 μ M) extraída y aislada de *Hypospongia* spp también un potente inhibidor de la DNA polimerasa- β . (Hollowood *et al*, 2003).

En cuanto a los **flavonoides** se han descrito el kaempferol (Figura 50) (IC₅₀ entre 150–200 μ M) aislado de *Dryopteris crassirhizoma* Nakai (Min *et al*, 2002), la hinokiflavona (IC₅₀ de 65 μ M) aislada de *Rhus succedanea* L y *Ajuga decumbens* Thunberg (Lameira *et al*, 2006), la quercetina (IC₅₀ entre 150–200 μ M) aislada de *Ochna integerrima* Lour. Merr y la ochnaflavona (figura 66) y dihidro-ochnaflavanona (IC₅₀ entre 2,0–2,4 μ M) aisladas de *O. integerrima* (Reutrakul *et al*, 2007), la miricetina (IC₅₀ entre 150–200 μ M) aislada de *Caragana rosea* Turcz (Yang *et al*, 2007), y el 2-metoxi-3-metil-4,6-dihidroxi-5-(3'-hidroxi)-cinnamoilbenzaldehído (IC₅₀ de 0.022 μ g/mL) aislado de *Desmos* spp (Cos *et al*, 2008).

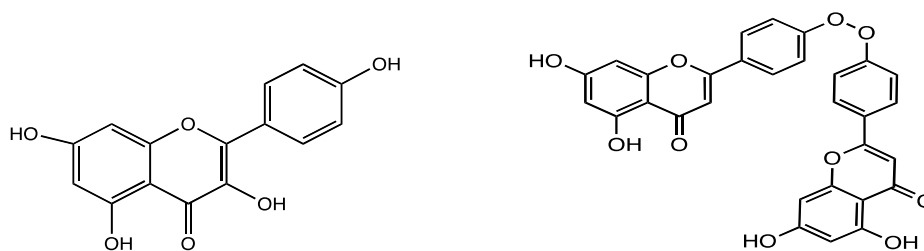


Figura 50. Kaempferol y Ochnaflavona, flavonoides con actividad antiRT, de origen natural

Parece ser que la presencia del doble enlace en posición 2–3 del anillo γ -pirona se relaciona con una mayor actividad y que los grupos hidroxilo en 5 y 7 parecen imprescindibles para la actividad inhibitoria de la RT. (Ono *et al*, 1990)

Considerando la posibilidad de **inhibición de la integrasa**, la proteína MAP-30 aislada y purificada de la especie *Momordica charantia* (Cucurbitaceae), actuaría a nivel de varias etapas del ciclo vital del virus, en infección aguda y en células con infección crónica (Lee *et.al.*, 1995). Las investigaciones apuntan que el mecanismo de acción esta relacionado con la inhibición de la IN viral. Esta enzima es la que posibilita la integración del complejo de preintegración del ADN proviral en el genoma de la célula infectada. En otro estudio, la proteína MRK29 extraída de la misma planta, se demuestra que es un inhibidor de caracter protéico de la RT del VIH. (Jiratchariyacul W, *et al.*, 2001). Esta proteína parece tener un papel modulador de la respuesta inmunitaria, al incrementar la actividad del TNF- α .

El ácido 1,5–dicafeoilquínico aislado de *Baccharis coridifolia* Lam. (Garcia *et al*, 2002) mostró una potente actividad inhibitoria de la IN del VIH–1 (IC_{50} entre 1–6 μ M), ocupando de manera irreversible el sitio catalítico del enzima en líneas de células T, también inhibe la RT, la PR del VIH en células MT–4 con valores de IC_{50} de 25 y 46 μ M, respectivamente. La curcumina, un pigmento amarillo de la cúrcuma (*Curcuma longa* L), (Sing & Bodiwala, 2010) mostró actividad antitumoral, antiinflamatoria y anti–VIH, inhibiendo la IN del VIH–1 con un valor de IC_{50} de 40 μ M para la reacción de transferencia de cadena.

La oleuropeina, secoiridoide aislado en la hoja del olivo (*Olea europea* L., Oleaceae) se hidroliza para dar el compuesto fenólico **hidroxitirosol**, molécula muy pequeña, que inhibe el ciclo vital del VIH-1 a diferentes niveles : interacciona con el bolsillo hidrofóbico de la superficie del complejo de fusión HIV-gp41, con el bucle de seis hélices, y con el dominio catalítico del sitio activo de la IN viral (Lee-Huang *et al.*, 2007a y 2007b))... Esta molécula, identificada también en muchas plantas, es uno de los agentes antioxidantes más potentes que se conoce (Rafehi *et al.*, 2012)...El hidroxitirosol es activo en VIH con diferentes tropismos, tanto en líneas celulares (MT-2) como en células mononucleares de sangre periférica con CI_{50} entre 30 y 90 μ M,

Se han encontrado también productos naturales con **nuevos y prometedores mecanismos de acción** frente al VIH. Este es el caso de la nirurisida, un heterósido fenólico aislado del *Phyllanthus niruri* L., que inhibe específicamente la unión de la proteína viral Rev al ARNm viral, unión que es necesaria para que las hebras del ARNm viral sean transportadas del núcleo al citoplasma celular, con lo que impide la replicación del VIH (Quiancutrone *et al.*, 1996).

Si bien se conocen muchos compuestos con actividad anti-VIH, únicamente un número limitado de ellos se encuentra en **alguna fase de ensayos clínicos** (Saklani & Kutty, 2008). Algunos ejemplos son el calanólido A, una cumarina aislada de los frutos del árbol *Calophyllum lanigerum* Miq. var. *austrororaceum* (TC Whitmore) PF Stevens (Guttiferare) que se encuentra en ensayos en fase II (Creagh *et al.*, 2001). Esta cumarina también es activa frente a *Mycobacterium tuberculosis*, por lo que resultaría eficaz en pacientes con SIDA que además presenten tuberculosis. Otra cumarina que se encuentra en ensayos clínicos en fase I frente al VIH, es la 3-hidroximetil-4-metil-khellactona, derivados aislados de los rizomas de *Angelica purpuraeifolia* Chung y que a su vez esta relacionada con la cumarina natural suksdorfina, que es activa frente a cepas resistentes del VIH-1. También se encuentra en ensayos clínicos en fase I, el ácido 3,5-di-O-cafeoilquínico aislado de la *Inula británica* L. (Asteraceae), que es un inhibidor de la IN del VIH y del virus de la hepatitis C, una proantocianidina oligomérica aislada del látex del *Croton lecheri* Mull. Arg., para el tratamiento de diarreas producidas por coronavirus (ensayos clínicos en fase III) (Cottreau *et al.*, 2012), y en fase IV para el tratamiento de pacientes con hepatitis C, un derivado semisintético del alcaloide natural castanospermina (Durantel, *et al.*, 2009).

Una cumarina ya comercializada como suplemento dietético en Europa (4-metilumbeliferona) y que esta presente en numerosas plantas, se encuentra actualmente en ensayos clínicos en fase II para el tratamiento de pacientes con hepatitis B y C. Por último, mencionar el *bevirimat*, uno de los primeros fármacos anti-VIH con un nuevo mecanismo de acción, los denominados inhibidores de la maduración, que se encuentra en ensayos en fase IIb para el tratamiento de pacientes con SIDA. El *bevirimat* ó ácido 3-O-(3',3'-dimetilsuccinil) betulínico, es un derivado semisintético del triterpeno ácido betulínico aislado de las hojas del *Syzygium claviflorum* (Roxb.) Wall. ex A.M. Cowan & Cowan (Myrtaceae).

También se encuentran en ensayos clínicos extractos normalizados de varias especies vegetales; por ejemplo, un extracto normalizado (sho-saiko-to) compuesto por infusión de la raíz de la *Scutellaria baicalensis* Georgi, raíz de *Glycyrrhiza uralensis* Fisher, *Bupleurum chinense* DC., raíz de *Panax ginseng* C.A. Mayer, *Pinellia*

ternata (Thunb.) Breit, fruto de *Ziziphus jububa* Mill., y el rizoma de *Zingiber officinale* Rosc., que se encuentra en ensayos clínicos fase II para determinar su efecto en pacientes con hepatitis C y otros trastornos hepáticos (Lee *et al.*, 2011; Deng *et al.*, 2011).

6. ANTIVIRALES DERIVADOS DE POLISACARIDOS

6.1 Polisacaridos con actividad antiherpética

Entre diferentes **polisacáridos neutros** de origen vegetal, el escleroglucano, extraído del hongo *Sclerotium glaucum*, inhibe de una forma significativa la replicación del **VHS-1** en células Vero (Marchetti *et al.*, 1996). Ésta actividad se la relaciona con la formación de puentes con glicoproteínas de la membrana del virus, que impide la interacción con la célula huésped.

Desde hace mucho tiempo, se sabe que muchos polisacáridos afectan al crecimiento de los virus, en particular, polisacáridos aniónicos (heparina, dextran sulfato, carragenanos, pentosanos polisulfatos, fucoidanos, xilogalactanos sulfatados), que son potentes inhibidores de la unión del VHS a la célula huésped (Rabanal, *et al.*, 2013). Parece ser que la presencia de grupos carboxílicos y N-sulfato, como ocurre en la heparina, son claves determinantes en la actividad anti VHS-1 y VHS-2 (Zhang *et al.*, 2007). Estos polisacáridos antiherpéticos han sido aislados de organismos y microorganismos, tanto marinos como terrestres, pero la principal fuente son las algas marinas (Abad *et al.*, 2008).

Diversos estudios demuestran la actividad de complejos polisacáridos sulfatados extraídos de varias especies de algas marinas, sugiriendo que interfieren en el ataque del virión a la célula huésped. Es el caso de extractos polisacarídicos de algas rojas y pardas de Nueva Zelanda (*Undaria pinnatifida*, *Splachnidium rugosum*, *Gigartina atropurpurea*, y *Plocamium cartilagineum*), que presentan gran actividad cuando se añaden durante la primera hora de la infección viral (antes de la inoculación viral), siendo inefectivos si se añadían después (Harden *et al.*, 2009). Lo mismo se describió para un polisacárido sulfatado aislado del alga parda *Sargassum patens*, a una concentración de 100 µg/mL (Zhu *et al.*, 2006). Otro compuesto de este tipo aislado de otra alga parda, *Hydroclathrus clathratus*, resultó ser un potente inhibidor del VHS-1, incluyendo a una cepa resistente a *aciclovir* (Wang *et al.*, 2010a). El polisacárido en cuestión inhibió la formación de placas de forma dosis-dependiente, aunque se demostró claramente que no actuaba sobre el ciclo de replicación del virus, sino más bien sobre el ataque del virus a la célula huésped, interfiriendo en el proceso de absorción o penetración. El mismo mecanismo de acción fue descrito para un xilogalactofurano sulfatado aislado del alga parda *Sphacelaria indica* (Bandyopadhyay

et al., 2011), y un galactano sulfatado aislado del alga verde *Codium fragile* (Ohta et al., 2009).

Dos polisacáridos sulfatados aislados de dos algas rojas, *Sphaerococcus coronipifolius* y *Boergesemiella thuyoides*, también inhiben la adsorción del VHS-1 a células Vero (Bouhlal et al., 2011). Este polisacárido también es activo frente a VIH-1. El mismo mecanismo de acción lo presenta un xilano sulfatado aislado del alga roja *Scinaia hatei* (Mandal et al., 2010).

Polisacáridos sulfatados con actividad anti-VHS-1 y anti-VHS-2 también han sido aislados de microorganismos marinos (Arena et al., 2006; Arena et al., 2009). Según los autores parece ser que el efecto antiviral esta mediado por las propiedades inmunomoduladoras de estos compuestos, lo que podría restaurar el equilibrio inmunológico después de que la célula fuese infectada por el VHS.

Una fracción polisacárida extraída de *Prunella.vulgaris*, redujo la expresión del antígeno para HSV-1 y HSV-2 en células Vero, y además también redujo la expresión antigénica de resistencia al *aciclovir* (Chiu et al., 2004). Unos años mas tarde, se aisló un complejo lignina-polisacárido de ésta misma planta, describiendo una inhibición directa en la acción del HSV-1 (Zhang et al., 2007). Este compuesto bloquea la adhesión del virus a la célula Vero y también su penetración (CI₅₀ de 18 µg/mL y de 17 µg/mL) en cepas resistentes a *aciclovir*, reduciéndose un 86% la infectividad viral. La actividad *in vivo* de la crema de *Prunella*, formulada con una fracción lignina-polisacárido semipurificada, resultó ser elevada sobre lesiones en la piel de cobayas, presentando una reducción significativa de las lesiones herpéticas similar al grupo tratado con *aciclovir*. También en ratones infectados con HSV-2 genital, se describió una reducción de la mortalidad. Cabe destacar que en este mismo estudio se demuestra la clara implicación de la fracción polisacárida en la actividad antiviral, no siendo así para la fracción de lignina.

Sin embargo, existe un ensayo clínico con una combinación de una lignina aislada del fruto del *Pinus densiflora* Sieb. et Zucc con ácido ascórbico, para el tratamiento de pacientes afectados de VHS-1 (López et al., 2009). Los pacientes que tomaron esta combinación dentro de las primeras 48 horas desde que comenzaron los síntomas de la infección, no desarrollaron las lesiones herpéticas características, mientras que en aquellos que comenzaron el tratamiento más tarde, la duración de las lesiones herpéticas y la gravedad de las mismas, era menor que en episodios anteriores. Otro complejo carbohidrato-lignina con actividad antiherpética (VHS-1 y -2) fue aislado de los frutos del anís (*Pimpinella anisum* L.) (Lee et al., 2011). El compuesto interfiere a nivel de la adsorción del virus en la célula huésped, y también presenta propiedades

inmunomoduladoras. Estos complejos carbohidrato-lignina están ampliamente distribuidos en el reino vegetal, y son uno de los principales componentes de las paredes celulares vegetales (Sakagami *et al.*, 2010).

De la infusión de una planta muy utilizada en la cocina asiática, *Basella rubra* L., se han aislado cuatro polisacáridos neutros y cuatro ácidos (Dong *et al.*, 2011 ; Dong *et al.*, 2012). Todas estas moléculas presentan actividad frente al VHS-2, al interferir con la adsorción y penetración del virus en la célula huésped. Adicionalmente, solo uno de los polisacáridos ácidos presenta una actividad moderada *in vivo* en ratones infectados intravaginalmente con VHS-2.

De la planta india *Tridax procumbens* L. (Asteraceae), se ha aislado otro polisacárido sulfatado con actividad antiviral frente a VHS-1 (CI₅₀ 100-150 µg/mL) en células Vero (Naqash & Nazeer, 2011). El contenido en sulfato de este polisacárido (2%), corrobora la hipótesis comprobada con el VIH-1, de que la actividad antiviral de estas moléculas depende del grado de sulfatación.

Sin embargo, polisacáridos no sulfatados también se han identificado como inhibidores del VHS. Por ejemplo, un polisacárido aislado de la planta medicinal china *Portulacca oleracea* L. (Portulacaceae), que inhibe la penetración del VHS-2 en células Vero (Dong *et al.*, 2010). Este polisacárido es una pectina con cantidades apreciables de ácido galacturónico, galactosa, ramnosa y arabinosa.

Se han descrito arabinogalactanos que difieren mayoritariamente en la proporción relativa de arabinanos, y en el contenido en residuos de D- galactopiranosas como antivirales contra VHS-1 (Braz de Oliveira, *et al.*, 2013).

Se ha encontrado un galactomanano químicamente sulfatado aislado de *Mimosa scarabella* L. con actividad anti-VHS-1 (Chrestani *et al.*, 2009). Esta es una planta parásita de la familia de las Leguminosas. Los grupos sulfatados responsables en principio de la acción se encuentran mayoritariamente en el C-6 de los residuos de galactosa (CI₅₀ menor de 2,5µg/mL).

Es importante destacar, respecto a los polisacáridos, que una idea que ha surgido recientemente es la introducción de grupos funcionales, que permitan cambiar la polaridad, conformación o densidad, y que favorezcan o aumenten la actividad antiviral. Esto se constata muy bien en un estudio llevado a cabo en 2011, donde se produce la modificación química de un polisacárido neutro extraído de *Polygonatum cyrtoneura* Hua, una planta de la familia de las Asparagaceas muy utilizada en medicina tradicional china. Se desarrollan derivados sulfatados, fosforilados, acetilados, y sulfonilados, y se comparan su actividad antiherpética frente al polisacárido natural, usando el ensayo de inhibición del efecto citopático en células

Vero (Liu *et al.*, 2011a). Los derivados más activos frente a VHS-1 son los derivados fosforilado y sulfatado; sin embargo, no fueron activos en VHS-2. De esta planta se había aislado previamente un polisacárido neutro tipo fructano, que inhibe *in vitro* la replicación del VHS-1 y -2 en células Vero (CE₅₀ 3,9 y 8 µg/mL, respectivamente), y además tiene actividad *in vivo* para el tratamiento de la queratitis ocular inducida por VHS-1 en ratón (Liu *et al.*, 2004).

6.2 Polisacáridos con actividad sobre otros virus

Todos los retrovirus y mixovirus que son sensibles a la acción inhibitoria de estos polisacáridos, comparten un segmento peptídico de tres aminoácidos, que podría estar relacionado con la acción inhibitoria de estos compuestos (Hosoya *et al.*, 1991).

Se han encontrado también referencias de la actividad de polisacáridos, sulfatados y no, frente a otros virus tanto ARN como ADN. Por ejemplo, el polisacárido homogéneo compuesto de un esqueleto de galactosa conjugado con ácido urónico y grupos sulfato extraído de un alga marina, la *Gyrodinium impudium*, cuyo mecanismo de acción se describió como que interfería en la adsorción e internalización del virus influenza A, un virus ARN (Kim *et al.*, 2012). También los carragenanos, aislados fundamentalmente de algas rojas, que inhiben la replicación del virus de la gripe A (H1N1) (Wang *et al.*, 2011). Estos polisacáridos parece ser que no interfieren en la entrada del virus en la célula, sino en un paso posterior del ciclo del virus.

También los polisacáridos ácidos aislados de la planta asiática *Basella rubra* presentan actividad anti-influenza *in vivo* (Dong *et al.*, 2011). La administración oral de estos polisacáridos a ratones infectados intranasalmente con el virus de la influenza A, presenta una eficacia terapéutica moderada al estimular la producción de anticuerpos frente a este virus, y la secreción de IgA.

Para evaluar el efecto antidiarreico del ginseng, Baek *et al.* (2010) estudiaron los efectos de dos polisacáridos pécticos, en modelos *in vitro* de infección por rotavirus. Ambos polisacáridos presentaban una estructura común de homogalacturonanos, con regiones de ramnogalacturonano tipo 1 que pueden ser sitios funcionales; y parece ser que las cadenas ricas en arabinosa de uno de ellos, contribuye en la inhibición del ataque del rotavirus a las células.

El extracto acuoso de *Ardisia chinensis* Benth, planta medicinal china, resultó activo frente al virus Cocksackie B3 (Su *et al.*, 2006). El compuesto responsable se identificó como un polisacárido. Su caracterización determinó que se trataba de un polisacárido neutro cuya fracción mayoritaria es la glucosa. De los frutos del anís, se aisló un

complejo carbohidrato-lignina con actividad frente al CMV (virus ADN), y frente al virus del sarampión (virus ARN) (Lee *et al.*, 2011).

Otro polisacárido sulfatado, el fucoidano aislado del alga marina *Cladosiphon okamuranus*, es activo frente al virus del dengue, un virus con envuelta responsable de importantes infecciones en el hombre (Hidari *et al.*, 2008). Este polisacárido interacciona directamente con las glicoproteínas de la envuelta del virus, y para ello parece ser que es fundamental la presencia de grupos sulfato.

También algunos polisacáridos son activos frente a virus que afectan a los vegetales, como los polisacáridos sulfatados aislados de algas marinas, como galactanos sulfatados, y κ - y β -carragenanos aislados del alga roja *Tichocarpus crinitus*, que son activos frente al virus del mosaico del tabaco (Nagorskaia *et al.*, 2008; Vera *et al.*, 2011).

6.3 Polisacáridos con actividad anti- VIH

Los polisacáridos sulfatados inhiben la entrada del VIH debido a la interacción directa con el bucle V3 de la gp120 viral (Hashimoto *et al.*, 1996). Se trata de macromoléculas de elevado peso molecular constituidos por hexosas, pentosas o ácidos urónicos que en algunos casos pueden sulfatarse. Estos últimos son los primeros en presentar de manera contrastada su actividad; entre estos podemos mencionar la heparina, carragenina y acemanano cuya actividad frente a VIH *in vitro*, viene descrita desde la década de los años 90 (Tilton & Doms, 2010).

El principal inconveniente en estas moléculas es la baja biodisponibilidad por vía oral, y que la administración intravenosa puede producir trombocitopenia, por lo que su utilización puede verse limitada a la vía tópica (de Clercq, 1995).

El acemanano, otro polisacárido aislado como inmunomodulador de *Aloe Vera* L., mostró actividad sinérgica con inhibidores de la TI del VIH como el AZT (Kahlon *et al.*, 1991). Sin embargo, un ensayo clínico con éste compuesto demostró que no protege frente a la caída de linfocitos CD4, característica del VIH (Montaner *et al.*, 1996).

Recientemente, existe un mayor interés por agentes anti-VIH derivados de organismos y microorganismos marinos, como los quitooligosacáridos, polisacáridos sulfatados, lectinas y péptidos bioactivos. (Vo & Kim, 2010; Kim & Karadenic, 2011; Jiao *et al.*, 2011).

Se han descrito polisacáridos extraídos de *Fucus vesiculosus*, alga parda, que actúan a nivel de la entrada del VIH en la célula hospedadora (Morya *et al.*, 2012). Se trata de polisacáridos sulfatados cuya actividad antiviral depende precisamente del grado de

sulfatación de la molécula. Estos polisacáridos con actividad anti-VIH, también se presentan en el alga parda marina *Ecklonia cava* (Wijesinghe & Jeon, 2012).

En el caso de los fucoidanos extraídos de otro alga marina, la *Adenocystis utricularis*, y que ya se conocía su actividad antiherpética, resultaron tener actividad anti-VIH *in vitro*. En este caso, el efecto inhibitorio no es debido a una inactivación de la partícula viral, sino a un bloqueo en los eventos tempranos a la replicación, lo que hace pensar en la posibilidad de utilizar estos compuestos como posibles candidatos para profilaxis de la infección por VIH (Trinchero *et al.*, 2009).

Polisacáridos extraídos de algas rojas (*Grateloupia filicina* y *Grateloupia longifolia*), con un contenido en sulfato de 25 y 18% respectivamente, presentaron una potente actividad anti-HIV-1 cuando se añaden al mismo tiempo de infección y dos horas post-infección (CE_{50} 0,010-0,003 μ M) (Wang *et al.*, 2007a). Presentan además, una baja citotoxicidad. Este mismo mecanismo de acción lo presentan los polisacáridos sulfatados aislados del alga roja del Mediterráneo *Asparagopsis armata* (Haslin *et al.*, 2001).

De dos algas rojas, en este caso procedentes de las costas de Marruecos, *Sphaerococcus coronopifolius* y *Boergeseniella thuyoidea*, se aislaron dos polisacáridos sulfatados con actividad anti-VIH (Bouhlal *et al.*, 2011). El polisacárido de *Sphaerococcus coronopifolius* esta compuesto por galactosa, 3,6-anhidrogactosa, ácidos urónicos y sulfato, en proporciones 33,1, 11, 7,7 y 24%, mientras que el de *Boergeseniella thuyoidea*, la proporción es de 25,4, 16, 3,2 y 7,6%, respectivamente. Los polisacáridos ejercen un efecto inhibitorio directo sobre la replicación del VIH a 12,5 μ g/mL, impidiendo la formación de nuevos viriones.

Sin embargo, los polisacáridos más comunmente extraídos de algas marinas son el agar y los carragenanos, ampliamente utilizados en la industria cosmética y alimentaria. Se trata de polisacáridos sulfatados extraídos principalmente de algas rojas. Se ha investigado una combinación de un carragenano con un ITINAN (MIV-150) como microbicida por vía tópica, demostrándose un efecto sinérgico, por lo que podría ser útil para prevenir la transmisión de enfermedades sexuales (Fernández-Romero *et al.*, 2007).

Polisacáridos sulfatados han sido aislados también de microorganismos marinos, como bacterias (Poli *et al.*, 2010). Estas moléculas interfieren a nivel de la adsorción y penetración del VIH en la célula, e inhiben la TI. Esteves *et al.*, 2011) aíslan diferentes polisacáridos sulfatados de tres especies de esponjas marinas del Atlántico Norte : *Erylus discophorus*, *Cliona celata* y *Stelletta* spp. Las investigaciones apuntan a que el

mecanismo de acción anti-VIH consiste en prevenir la entrada del virus en la célula (inhibidores de la fusión).

Algunas de estas moléculas se encuentran ya en ensayos clínicos, como es el caso del polimannuroguluronato sulfatado aislado de algas pardas(PMGS), que se encuentra en ensayos en fase II en China. Esta molécula interfiere con la proteína viral *Tat*, protegiendo a las células de la apoptosis, además de disminuir el estrés oxidativo mitocondrial (Miao *et al.*, 2005 ; Hui *et al.*, 2008). Este compuesto también presenta efecto antiangiogénico en cultivos de células de sarcoma de Kaposi, una neoplasia frecuentemente asociada a SIDA (Lu *et al.*, 2007).

Las plantas terrestres proporcionan este tipo de macromoléculas sulfatadas que van a actuar a diferentes niveles del ciclo vital del VIH. Aislado de *Thuja occidentalis* L., un polisacárido inhibe la RT del VIH-1, y aumenta la producción de citocinas por los linfocitos CD4 a esta molécula se le ha denominado “Thuja polisacárido g” o conocido como el (TPS_g). (Offergeld *et al.*, 1992) (Hassan *et al.*, 1996). Del la cascarrilla de las semillas del cacao se aísla un complejo carbohidrato-lignina con actividad anti-VIH e inmunomoduladora (Sakagami *et al.*, 2011, 2012), y un β -glucano sulfatado de la avena (*Avena sativa* L., Poaceae) (Wang *et al.*, 2008b). Aislado de la planta medicinal china *Achyranthes bidentata* Blume, un polisacarido sulfatado que inhibe la TI y la IN *in vitro* (Peng *et al.*, 2008). Este polisacárido también ha sido investigado *in vivo*, aunque presenta una baja biodisponibilidad por vía oral.

Del extracto acuoso del *Chelidonium majus* L., una planta medicinal incluida en numerosas farmacopeas europeas, se ha aislado un poliglucosaaminoglucano de bajo peso molecular, que inhibe la TI *in vitro* (Gerencer *et al.*, 2006). Adicionalmente, esta molécula, *in vivo*, previene la esplenomegalia y el crecimiento de los nódulos linfáticos en ratones infectados con el retrovirus de la leucemia murina.

El principal inconveniente de estos compuestos como venimos reseñando es su baja biodisponibilidad por vía oral, lo que provoca que únicamente puedan ser utilizados como antivirales de uso tópico (de Clerq, 1995). De hecho, es importante destacar que ya desde hace una década se están desarrollando formulaciones en forma de geles con polisacáridos como microbicidas, es decir aplicados en las mucosas, para prevenir infecciones. En el apartado de agentes antivirales, se han descrito los microbicidas hasta ahora ensayados y su uso actual.

7. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA. PLANTAS MEDICINALES

Género *Tuberaria*

7.1. Estudio botánico *Tuberaria*

El género está incluido en la familia de las Cistáceas. En esta familia, se reúnen ocho géneros y 200 especies, mayoritariamente arbustos y matas, aunque podemos encontrar algún género herbáceo, por ejemplo el género *Tuberaria* (Dunal) Spach., anuales o perennes.

Habitan generalmente en países de clima templado del hemisferio norte, principalmente la región mediterránea.

7.1.1 Taxonomía

División	<i>Magnoliophyta</i> (Angiospermas)
Clase	<i>Magnoliatae</i> (Dicotiledóneas)
Subclase	<i>Dillenidae</i>
Orden	<i>Violales</i>
Familia	<i>Cistaceae</i>
Género	<i>Tuberaria</i> (Dunal) Spach.
Especie	<i>Tuberaria lignosa</i> (Sweet) Sampaio.

7.1.2. Morfología y descripción botánica

Tuberaria (Dunal) Spach., nombre aceptado según la Flora Ibérica (descrita en *Ann. Sci. Nat. Bot.*, ser. 2, 6: 364, 1836).

Entre la Península Ibérica y Baleares, podemos encontrar nueve especies. Su identificación resulta complicada, ya que además de ser muy variables, hibridan entre sí. Son hierbas anuales o perennes, rara vez con base leñosa, y crecen principalmente en pastizales de suelos ácidos. Sus flores son similares a las de las jaras (*Cistus ladanifer* L., Cistaceae), aunque sus pétalos son amarillos y de



Figura 51. *Tuberaria lignosa*.
www. Flora vascular.com

menor tamaño, a veces mas cortos que los sépalos.

El nombre del género se debe a que estas plantas suelen crecer cerca de hongos del género *Terfecia*, llamadas comúnmente criadillas de tierra, y que son parecidos a las trufas (género *Tuber*). Los cuerpos fructíferos se forman junto a las raíces, y son recolectados para su consumo, de ahí que estas plantas reciban el nombre de “hierbas turmeras”.

La descripción botánica del género viene dada por Flora Ibérica (1997). Es frecuente la hibridación entre la mayoría de los taxones, y a veces, el posterior retrocruzamiento del híbrido con uno de los progenitores, lo que origina individuos con nuevas combinaciones de caracteres,

Las nueve especies conocidas en la Península Ibérica son:

- *Tuberaria guttata* (Lam) Fourr
- *Tuberaria conmutata* Gallego
- *Tuberaria echioides* (Lam) Willk
- *Tuberaria lignosa* (Sweet) Sampaio
- *Tuberaria globuloniifolia* (Lam) Willk
- *Tuberaria plantaginea* (Gallego) Willk
- *Tuberaria brevipes* (Boiss & Reut) Willk
- *Tuberaria macrosépala* (Salzm. ex. Boiss) Willk
- *Tuberaria praecox* (Salzm. ex. Boiss & Reut) Grosser



Figura 52. *Tuberaria lignosa*(Sweet) Sampaio
www.florasilvestre.es

Características botánicas de la especie *Tuberaria lignosa*

Tuberaria lignosa (Sweet) Samp. (descrita en Bol. Soc. Brot. Ser 2,1: 128,1922). Hierba perenne, rizomatosa y leñosa en la base. Tallos de hasta 57cm, ascendentes, ramificados, pubescentes en la base. Hojas sin estípulas; las basales de (3)3,6-6,5(10) × (0,9)1,1-1,8 (3,4)cm, subespatuladas u oblanceoladas, agudas u obtusas y mucronadas, atenuadas en corto y ancho peciolo, con 3(5) nervios, blanquecinas densamente pubescente por el envés (con pelos estrellados) y, de jóvenes, además, seríceas, y con pelos escamosos de perfil estrellado por el haz, y, de jóvenes además con pelos

estrellados; las caulinares, sentadas de ovadas a lineares, agudas. Inflorescencia laxa; brácteas de ovalado lanceoladas a lineares, agudas; pedicelos (9) 12-24 mm, erecto-patentes en la antesis y reflejos en la fructificación. Sépalos glabros; los extremos de



Figura 53. Inflorescencia de *Tuberaria lignosa*
www. fotonatura.org

(1,5)3,5-7,5 \times (0,3)0,5(1,4) mm, linear-lanceolados; los internos de 9-15(17) \times (5)6,5-8(9)mm, ovado-lanceolados. Pétalos de 10-15mm. Filamentos estaminales amarillos; anteras (0,4)0,5-0,75mm. Ovario densamente estrellado pubescente; estilo 0,4-0,5 mm; estigma 1-1,3mm de diámetro, hemisférico. Cápsula coriácea con pelos estrellados esparcidos, hispida en el ápice; valvas (5,8)6,5-8 \times (3,8)4,5-5,1mm, ciliadas en el tercio superior. Semillas (0,7)0,8-1(1,1)mm (2n=14; n=7).

Abunda en pastos, matorrales y sotobosques poco densos, ricos en terófitos, sobre el suelo ácido: oeste de la región mediterránea y Canarias, casi toda la Península Ibérica, principalmente hacia el oeste, y Menorca. La polinización es entomófila (sobre todo mediante escarabajos y mosquitos). Los insectos las visitan atraídos por la gran producción de polen (el néctar o no se produce, o se hace en muy poca cantidad). Sin embargo, también hay casos de cleistogamia en esta familia.

Nombres comunes: “hierba turmera”; portugués: “alcar”; catalán: “hierba tofonera”; gallego: “loitosiña”.

7.2. Estudio fitoquímico *Tuberaria*

Existen pocas referencias bibliográficas acerca de la composición química de especies de este género. En concreto, solo se ha encontrado referencias acerca del contenido en compuestos polifenólicos en la especie *T. guttata* (Vázquez de Aldana *et al.*, 2009), y la presencia de elagitaninos reportada por nuestro grupo, en la especie *T. lignosa* (Bedoya *et al.*, 2010).

7.3 Actividad farmacológica y usos terapéuticos tradicionales *Tuberaria*

Las especies de esta familia producen materia resinosas balsámicas. Las semillas contienen fécula, utilizada para panificación mezclada con harina de los cereales, como es el caso de las semillas de la jara en el norte de Marruecos.

La resina denominada “ladano” de *C. ladanifer* o “jara”, y del *Cistus creticus* L. se utilizan en preparaciones con trementina o cera amarilla, para la curación de hernias, como aparece reseñado en la Farmacopea Matritense de 1823.



Figura 54. *Cistus ladanifer*. www.botanical-online.com

En Portugal, la especie que denominan vulgarmente “erua arcaz”, es la *T. lignosa*, utilizada en medicina tradicional para procesos inflamatorios y desinfección de heridas, de dos formas, con el cocimiento de la planta y utilizando su agua para lavar, o aplicando directamente las hojas machacadas sobre el lugar inflamado (Pieroni *et al.*, 2006). En el ganado también se utiliza con estos fines y se aplica de la misma forma. De hecho, existen estudios donde aparece reseñada la acción antiulcerosa y antiinflamatoria, concretamente del extracto acuoso de *T. lignosa* (Martin-Aragón S. *et al.*, 1994). Otra acción atribuida al extracto acuoso de esta planta es la antivírica frente a VIH (Bedoya *et al.*, 2001) donde resulta ser responsable de ello, el extracto acuoso enriquecido en elagitaninos (Bedoya *et al.*, 2010). Este extracto es activo *in vitro* en células MT2 infectadas con VIH. Esta inhibición parece ser mediada por la regulación en la disminución de CD4, y no por la actuación sobre los receptores para la entrada del virus CXCR4 y CCR5.

Género Satureja

7.4 Estudio botánico Satureja

Satureja boliviiana (Benth.) Briquet, una de las especies objeto del presente estudio, es un taxón que pertenece a la familia *Lamiaceae*.

La familia comprende unos 200 géneros, y cerca de 3200 especies herbáceas, de pequeños árboles y sobre todo de arbustos aromáticos.

Es una familia de distribución cosmopolita, aunque es más abundante en los países cálidos y templados, siendo particularmente importante en la región mediterránea.

7.4.1. Taxonomía

La taxonomía que se sigue para *S. boliviiana* fue dada por Heywood. en 1978 y es la siguiente:

División	<i>Magnoliophyta</i> (Angiospermas)
Clase	<i>Magnoliopsida</i> (Dicotiledoneas)
Subclase	<i>Asteridae</i>
Orden	<i>Lamiales</i>
Familia	<i>Lamiaceae</i> (<i>Labiatae</i>)
Género	<i>Satureja</i> Tourn.ex Mill.
Especie	<i>Satureja boliviiana</i> (Benth.) Briquet

En la Península Ibérica, las Labiadas están bien representadas con seis subfamilias, unos 36 géneros y cerca de 230 especies. Algunos géneros tan populares como *Thymus* L., *Salvia* L., *Lamiun* L., *Nepeta* L., *Melissa* L., *Mentha* L., *Satureja* etc. Muy apreciados debido a la riqueza en aceites esenciales, en perfumería, en medicina popular e incluso como condimento por su capacidad para actuar como conservantes y como correctores del sabor.

7.4.2. Morfología y descripción botánica

El género *Satureja* comprende principalmente arbustos de ramas ascendentes. Las flores con corola bilabiada, de color amarillo pálido, blanco rosa o púrpura; el cáliz con 11-13 nervios y cinco dientes; los estambres divergentes.

En *Flora Europea*, este género esta representado hasta el momento por doce especies, algunas de las cuales no están bien definidas (Tutin *et al.*, 1993).

- *Satureja athoa* K.
- *Satureja coerulea* Janka in Velen.
- *Satureja cuneifolia* Ten.
- *Satureja hortensis* L.
- *Satureja montana* L.
- *Satureja obovata* Lag.
- *Satureja pilosa* Velen.
- *Satureja rumelica* Velen.
- *Satureja salzmännii* P.W. Ball
- *Satureja spinosa* L.
- *Satureja thymbra* L.
- *Satureja parnassica* Heldr & Sart. ex Boiss.



Figura 55. *Satureja montana* L.
www.globedia.com

La especie *S. hortensis* abunda en el sur de España, se la conoce como “ajedrea de jardín” ó “saborija”. Más extendida en la Península, encontrándose en todo el territorio excepto en el norte, es la especie *S. montana*, que es la que en España se conoce con el nombre de “ajedrea”, ó con los sinónimos de “tomillo real” y de “hisopillo”. El aceite esencial de la ajedrea recuerda al del orégano, tomillo y salvia, en el 2011 la producción anual de aceite esencial de esta especie fueron de 4 toneladas siendo un mercado en creciente demanda. También abundan otras especies de *Satureja*; especialmente merece mencionarse la *S. obovata*, del sur de Aragón, que se conoce con los nombres de “tomillo real”, “hisopo real” y “saldorija” (Font Quer, 1995)

En la bibliografía sobre flora americana se encuentran las especies:

- *Satureja boliviana* (Benth.) Briquet
- *Satureja parviflora* Phil.

La distribución de *S. boliviana* va desde Perú, hasta Bolivia y Argentina, en altitudes de 2000 a 4000 m (Franquemont *et. al.*, 1990). *S. boliviana* se presenta como un arbusto perenne que crece espontáneo en el altiplano boliviano y en sus valles. (Girault, 1987).

En Bolivia, la *S. boliviana* se presenta en Cotani, La Paz, Larecaja, Sofatas, Tihuaraco, Achacachi, Sirupaya y Undavi, entre 2100 y 4000 metros sobre el nivel del mar. También se encuentra en Tucuman, Jujui, Salta, Anta y San Luis, en la República Argentina, entre 2500 y 2700 metros sobre el nivel del mar.

La especie S. boliviana es una hierba perenne de hojas muy pequeñas, con borde aserrado, subglabras. Flores en cimas laxas, en las axilas de las hojas superiores. Arbusto de hasta 1'5 m de altura, con tallos ramnosos, pubescencia más pronunciada en los nudos foliares. Hojas con peciolo glabros de 1'5 a 4 cm de longitud; láminas de 0'5 a 2'5 cm de longitud por 0'4 a 1 cm de ancho; lanceoladas, glabras o pubérulas en ambas caras. Flores solitarias, axilares, brevemente pedunculadas; cáliz de 2'5-3'5 mm infundibuliforme, con diez nerviaciones, pubescente en la cara externa; tubo de 2-2'5 mm de longitud, dientes deltoides, agudos, sublinguales, de 0'5-1 mm de largo.



Figura 56. *Satureja boliviana*.
www.herbolari73.blogspot.com

Corola blanca, de 8'5-10 mm de longitud, pilosa en el exterior del tubo y de los labios, glabra en la cara interior; tubo de 5'5-7 mm de longitud, labio superior entero. Filamentos estaminales exertos, superiores de 4 mm de longitud, inferiores de 6 mm de longitud. Estilo de 8-12 mm de longitud, exerto, ramas estigmáticas desiguales, la superior más corta. Clusas oblongas, tuberculadas, de 1'5 mm de longitud con mucrón de 0'5 mm". (Cabrera, 1953).

Otros sinónimos de ésta planta son:

- *Clinopodium bolivianum* Kuntze
- *Clinopodium kuntzeanum* Kuntze
- *Micromeria boliviana* Benth
- *Micromeria boliviana* Benth var. *angustifolia* Wedde
- *Satureja kuntzeana* Briquet
- *Xenopoma bolivianum* Griseb

Nombres comunes: en Bolivia y Colombia: “martín muña”, “khoa”, “pichuysisa”, “pampa muña”, “muña”, “té de indio”, “poleo” (Girault, 1987; Oblitas, 1992; Correa *et. al.*, 1994; Gupta, 1995).

7.5 Estudio fitoquímico *Satureja*

Numerosos estudios fitoquímicos revelan que los componentes mayoritarios en el género *Satureja* son aceites esenciales, taninos, compuestos fenólicos, esteroides, ácidos, gomas y mucílagos y pirocatecol. (Momtaz, & Abdollahi 2010)

La familia de las labiadas acumula preferentemente sustancias terpénicas, entre las que encontramos los aceites esenciales, de tal forma que esta familia engloba la mayor parte de las plantas conocidas como aromáticas por excelencia. Los principales componentes de los aceites esenciales son mono y sesquiterpenos, caracterizados por su alta volatilidad, tienen su localización habitual en los pelos epidérmicos de las hojas. Son clásicos en éste sentido, los trabajos sobre variaciones individuales (diarias y estacionales) de monoterpenos; así, por ejemplo el aceite esencial de *S. douglasii* (Benth.) Briq. de la costa pacífica americana, muestra una variación en la proporción de monoterpenos (monocíclicos/bicíclicos) en relación con el gradiente sur-norte de humedad costera. (Lincoln & Langenheim, 1978).

Los mayores constituyentes de los aceites esenciales en el género *Satureja* son fenoles, carvacrol, timol y flavonoides. (Sefidkon *et al* 2004).

En la especie *S. boliviana*, el aceite esencial contiene (Gupta, 1995):

- | | |
|-----------------------|--------------------------------------|
| ▪ borneol | ▪ carvacrol |
| ▪ acetato de borneol | ▪ 1,8-cineol |
| ▪ ácido butírico | ▪ citroneol |
| ▪ canfeno | ▪ m-cresol |
| ▪ p-cimeno | ▪ o-cresol |
| ▪ geraniol | ▪ nerol |
| ▪ acetato de geraniol | ▪ α -pineno y β -pineno |
| ▪ limoneno | ▪ timol |
| ▪ linalol | ▪ ácido valérico |
| ▪ acetato de linalol | ▪ ácido acético |

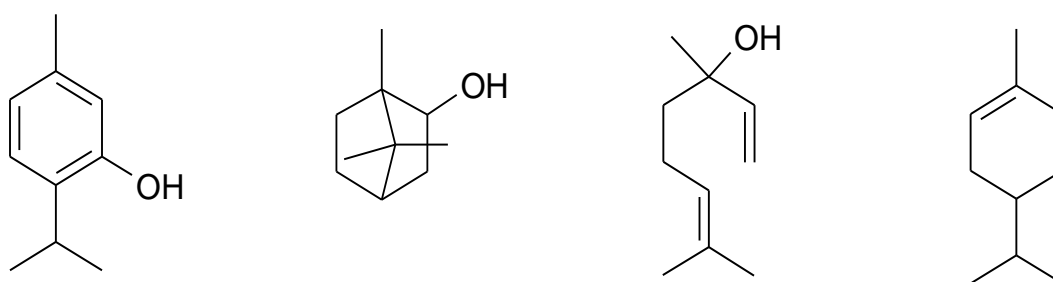


Figura 57. Aceite esencial de *S. boliviana*. Compuestos timol, borneol, linalol y limoneno

Posteriormente se han identificado también en el aceite esencial de *S. boliviana* peruana mentona e isomentona (Senatore *et. al.*, 1998), y en especies argentinas, o-cimeno, γ -terpineno y *trans*-cariofilleno (Viturro *et. al.*, 2000).

En la especie *S. hortensis* el aceite esencial esta compuesto por (Djenane *et. al.*, 2011a):

- | | |
|--------------------------------|---------------------|
| ➤ α -terpineol | ➤ p-cimeno |
| ➤ β -sitosterol | ➤ p-cimol |
| ➤ borneol | ➤ ácido rosmarínico |
| ➤ carvacrol | ➤ ácido esteárico |
| ➤ geraniol | ➤ terpinen 4-ol |
| ➤ ácido labiático | ➤ timol |
| ➤ ácido linoleico y linolénico | |

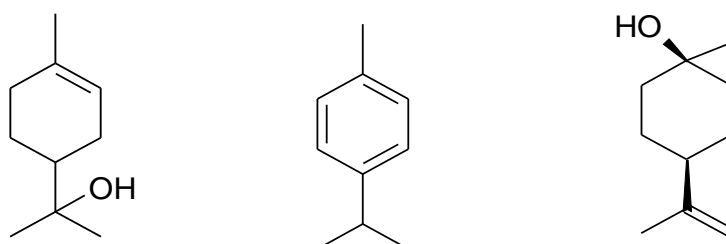


Figura 58. Aceite esencial de *S. hortensis*. Compuestos α -terpino, p-cimeno y β -terpineol

El rendimiento del aceite esencial de esta especie, *S. hortensis*, es máximo en la época de plena floración (Saharkhiz *et. al.*, 2011) y esta alrededor del 0,5%

En la especie *S. montana*, cuyo aceite esencial es utilizado en la región mediterránea como aditivo alimentario y agente aromático y saborizante, los principales componentes identificados han sido mirceno, p-cimeno, *trans* 4-tujanol, γ -terpineno, farnesol, carvacrol y timol (Djenane *et. al.*, 2011b). Sin embargo, otros estudios muestran también cantidades apreciables de β -bisaboleno, mientras que la fracción sesquiterpénica es relativamente pequeña (5-12%) (Grosso *et. al.*, 2010). En el aceite esencial de la especie mediterránea *S. parnassica*, se han identificado espatulenol, p-cimeno y linalol (Tzakou & Skaltsa, 2003), mientras que en el obtenido por destilación en corriente de vapor de la especie *S. timbra*, de Cerdeña, el componente mayoritario es el timol (Dell'agli *et. al.*, 2012).

La especie turca *S. cuneifolia*, presenta un aceite esencial cuyos componentes mayoritarios son timol (42%), γ -cimeno (22%) y carvacrol (9%), aunque también presenta linalol (3%), cariofilleno (2%) y borneol (2%) (Orhan *et. al.*, 2011). Otra especie del género, la serbia *S. kitaibellii* Wierzb. ex Heuff., proporciona un aceite esencial cuyo componente prioritario es el p-cimeno (Kundakovic *et. al.*, 2011). Esta planta es utilizada como especia y aditivo alimentario, debido a su característico sabor.

Hadian *et. al.* (2012) estudiaron la composición del aceite esencial de cuatro especies del género *Satureja* cultivadas en Irán: *S. bachtiarica* Bunge, *S. khuzistanica* Jamzad, *S.*

S. mutica Fisch. and C.A. Mey. *S. rechingeri* Z. Jamzad. Los componentes principales de todos los aceites esenciales son carvacrol y/o timol. El aceite esencial de una de estas especies, la *S. khuzistanica*, también presenta ácido rosmarínico (Hadian *et al.*, 2011).

El rendimiento del aceite esencial de la especie endémica griega *S. horvatii* L. subsp. *macrophylla*, se ve disminuido en terrenos de mayor altitud (Dardioti *et al.*, 2010). La composición de dicho aceite esencial también varía con el clima; así, en los taxones de la zona mediterránea predomina el carvacrol, mientras que el linalol ó hidrato de *trans*-sabineno y/o borneol, predominan en la zona sub-mediterránea. Otra especie del género procedente de Etiopía, la *S. punctata* L. subsp. *punctata*, presenta un aceite esencial rico en geraniol, nerol, α -bisabolol y (*E*)-nerolidol (Tariku *et al.*, 2010).

Una de las dos especies del género *Satureja* presente en el continente americano, la *S. parviflora*, tiene también un aceite esencial cuyos componentes mayoritarios son monoterpenos oxigenados (Lima *et al.*, 2011).

Son también abundantes los compuestos polifenólicos, entre ellos los ácidos fenólicos como ácido caféico, rosmarínico, clorogénico y ascórbico, y los flavonoides naringenina, eriodictiol y luteolina (Sánchez de Rojas *et al.*, 1996 a y b). Estos compuestos han sido aislados de la planta medicinal española *S. obovata*. De la especie *S. atropatana* Bonge, se han aislado cuatro flavonas muy metoxiladas : 5,6,3'-trihidroxi-7,8,4'-trimetoxiflavona, 5-desmetoxinobiletina, thimonina y luteolina (Gohari *et al.*, 2009).

Los flavonoides mayoritarios en *S. boliviana* son heterósidos de flavonoles, kaempferol 3-O-glucósido, kaempferol 3-O-xilosil glucósido, kaempferol 7-O-ramnósido y quercetina 3-O-soforósido (Lizarraga & Abdala, 2004)

La función fisiológica de estos flavonoides no se conoce bien, algunos son antioxidantes por quelación de metales, otros son inhibidores enzimáticos, o pantalla frente a radiaciones nocivas. Su función ecológica es más evidente, responsable del color de las flores, por tanto, "guías del nectar", al UV atraen a los polinizadores y los guían, favoreciendo así la reproducción de la especie.

7.6. Actividad farmacológica y usos terapéutico tradicionales *Satureja*

S. boliviana, es una planta utilizada en Bolivia en sahumeros y como condimento alimenticio, por sus características aromatizantes y por las propiedades conservantes. De olor agradable, ésta especie contiene un aceite esencial parecido al de la menta, el cual es muy usado en la industria farmacéutica, alimenticia y cosmetológica.

Los Kallawayas (curanderos originarios de la provincia Bautista Saavedra del Departamento de La Paz), utilizan medicinalmente *S. boliviana* de la siguiente manera (Girault, 1987): las hojas frescas, molidas y hervidas, en cataplasma para el tratamiento del reumatismo; en decocción, contra la migraña, mareos, "sorojche" (mal de altura o de montaña); también emplean las hojas frescas para envolver la carne y el pescado, y así evitar su descomposición; las hojas y flores frescas en infusión, tres veces al día como estomáquico (dispepsias, cólicos, carminativo); con polvo de alumbre en infusión, para lavar heridas infectadas; hojas y flores frescas o secas quemadas, para sahumeros insecticidas en las casas; frescas sin azúcar, en decocción muy caliente, como sudorífico en caso de fiebres benignas; hojas y flores secas para envolver y cubrir las "papas" nuevas, para así conservarlas.

Según Franquemont (1990), el té hecho con las hojas de *S. boliviana* se toma como estomáquico y para los resfriados, machacando las hojas y luego inhalándolo. La hierba fresca es usada para cocinar sopa de *Chuño* (un tipo de patata deshidratadas que

conservan durante años). Ésta especie se coloca en grandes cantidades en el almacén de los “chuños”, para protegerlas de los insectos que son repelidos por el olor despedido. De Lucca y Zalles en 1992, señalaron que los baños con decocción de *S. boliviana* son considerados como un remedio eficaz para la anemia y el raquitismo infantil. Las raíces constituyen uno de los elementos con que se realizan algunas ceremonias mágico-curativas.

La especie *S. montana* debido a su poder antiséptico, es utilizada para infecciones respiratorias y urinarias. Tradicionalmente también es usada para el tratamiento sintomático de trastornos digestivos, carminativo, localmente para el reuma y para la higiene bucal, (Bruneton, 1999). Font Quer en su *Dioscórides Renovado* (1995), menciona esta especie que “en forma de tisana después de las comidas ayuda a la digestión, también como lavativo, y como adobo de aceitunas”. Lo mismo ocurre con la especie *S. hortensis*, Youngken en su *Tratado de Farmacognosia* (1951), nos describe otro uso popular para ésta misma especie, como sazonador de carne de ave y para condimentar numerosos platos culinarios, de huevos, carnes, sopas, ensaladas y salsas.

Los Aceites esenciales de estas especies presentan gran importancia farmacológica, ya que su actividad radica, entre otras, en su poder antiséptico frente a bacterias patógenas variadas y otros microorganismos. Algunos también son activos frente a hongos inferiores responsables de micosis y frente a levaduras (*Candida*). Compuestos presentes en éstos aceites esenciales, como el citral, geraniol, linalol o timol, tienen un poder antiséptico superior al fenol.

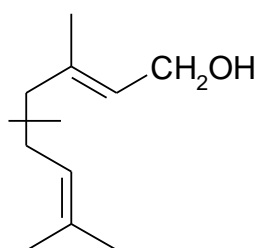


Figura 59. Geraniol

La capacidad antioxidante de los aceites esenciales del género *Satureja* ha sido confirmada en numerosos estudios (Radonic & Milos, 2003), Tanto el aceite esencial de la especie europea, *S. montana*, como algunos de sus principios activos, p-cimeno, γ -terpineno, geraniol y borneol, presentan actividad antioxidante *in vitro* (métodos del β -caroteno y del ácido tiobarbiturico). La infusión de esta planta, rica en compuestos polifenólicos, también presenta importantes propiedades antioxidantes y antiproliferativas (Cetojevic-Simin *et al.*, 2008; Serrano *et al.*, 2011). Pero las principales actividades reportadas para el aceite esencial de *S. montana*, son las antimicrobianas (Panizzi *et al.*, 1993; Silva *et al.*, 2009). El destilado es activo frente a la bacteria *Clostridium perfringens*, y el mecanismo parece estar relacionado con la lisis de la célula bacteriana (de Oliveira *et al.*, 2011). También presenta actividad frente a la bacteria *Listeria monocytogenes*, y

propiedades herbicidas, insecticidas y antihelmínticas (Michaelakis *et al.*, 2007; Carraminana *et al.*, 2008; Grosso *et al.*, 2010; Barbosa *et al.*, 2012).

También existen referencias acerca de la actividad antiviral de la *S. montana*. Un estudio muy interesante lo llevó a cabo un equipo compuesto por Yamasaki *et al.* (1998), estudiando la actividad anti-VIH-1 *in vitro* de 46 hierbas aromáticas de las Labiadas; en particular, los extractos acuosos de siete plantas entre las cuales se encuentran algunas mentas y la *S. montana*. Todas ellas presentan potente actividad anti-VIH-1, siendo los compuestos responsables de la actividad sustancias polares, solubles en agua, y no compuestos apolares como los aceites esenciales. Los extractos acuosos inhiben la formación de células gigantes, en co-cultivos de células Molt-4 con y sin infección por VIH-1, y presentan actividad inhibitoria frente a la TI. También se ha descrito actividad antifitoviral frente al virus del mosaico del tabaco y CMV, del aceite esencial de esta especie, y de dos compuestos aislados, como el carvacrol y timol (Dunkic *et al.*, 2010).

El aceite esencial de *S. hortensis* presenta actividad antimicrobiana significativa frente a Gram + y Gram – bacterias, y también antifúngica frente a *Candida albicans*, y es utilizada como conservante alimenticio y en el tratamiento de diferentes enfermedades humanas, e incluso para el tratamiento de plantas infectadas por fitopatógenos (Mihajilov-Krstev *et al.*, 2010; Mahbouli & Kazempour, 2011; Djenane *et al.*, 2011a). Ésta misma planta ha sido también probada frente a otros hongos como *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* y *Fusarium solani* (Ownagh *et al.*, 2010). Recientemente, este aceite esencial ha entrado en ensayos clínicos para el tratamiento de la estomatitis bucal (Sabzghabae *et al.*, 2012).

Investigaciones apuntan que carvacrol, timol y flavonoides aislados de *S. hortensis*, son los responsables de la marcada reducción de los niveles de colesterol sanguíneo en pacientes diabéticos (Mchedlishvili *et al.*, 2005). El extracto hidroalcohólico de esta especie, *S. hortensis*, también mostró actividad analgésica y antiinflamatoria en modelos animales, y el mecanismo de acción analgésico parece ser de origen central (Hajhashemi *et al.*, 2012).

En 2004, Gören *et al.*, estudian la acción del aceites esenciales de *S. thymbra* como antibacterianos frente a *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella thyphimurium*, *Shigella sonnei*, y *Staphylococcus aureus*. En el caso de *Bacillus cereus* y *Listeria monocytogenes*, el aceite esencial fue mas efectivo que la estreptomycin, siendo el carvacrol y el timol los componentes mayoritarios. Este aceite

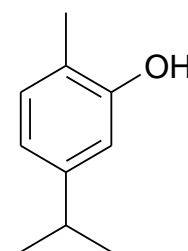


Figura 60. Carvacrol

esencial también presenta actividad frente a *Plasmodium falciparum*, el parásito responsable de la malaria, y propiedades antioxidantes y analgésicas en ratas y ratones (Karabay-Yavasoglu *et al.*, 2006; Dell'agli *et al.*, 2012; Giwelli *et al.*, 2012). En otro estudio, se valoró la actividad antifúngica de los compuestos fenólicos y terpenos, presentando éstos una marcada actividad por inhibición del crecimiento micelar en un rango de 2.5-5 µg/mL y 0,16-0,32 µg/mL, respectivamente (Piras *et al.*, 2011; Markovic *et al.*, 2011).

El aceite esencial de una especie de *Satureja* turca, *S. cuneifolia*, y alguno de sus componentes terpénicos aislados, presentan actividad frente a cepas bacterianas de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a los antibióticos β -lactámicos, cepas de *Staphylococcus aureus* meticilina-resistentes, y hongos como *Candida albicans* y *Candida tropicalis* (Kosar *et al.*, 2008; Orhan *et al.*, 2011). Este aceite esencial también presenta actividad inhibitoria de la acetil- y butirilcolinesterasas, y actividad analgésica *in vivo*, señalando como principio activo responsable al carvacrol (Aydin *et al.*, 1996; Orhan *et al.*, 2008). El extracto metanólico de esta especie también presenta actividad amebicida frente a *Acanthamoeba castellanii*, un protozoo causante de infecciones mortales en el hombre (Malatyali *et al.*, 2012). Estudios *in vitro*, muestran que el mecanismo de acción de este extracto puede estar relacionado con interacciones específicas de sus componentes con la pared celular de los parásitos. El extracto acuoso de esta planta, rico en compuestos polifenólicos polares, como hidroxibenzoatos, hidroxicinamatos y flavonoides, también presenta acción antioxidante (Dorman *et al.*, 2004).

De especies procedentes de Irán, los aceites esenciales de *S. bachtiarica*, *S. khuzistanica*, *S. mutica* y *S. rechingeri*, presentan actividad antibacteriana frente a bacterias Gram + y -, siendo más patente frente a *Bacillus cereus* (Hadian *et al.*, 2012). El aceite esencial de *S. bachtiarica* resultó más activo frente a bacterias Gram + como *Listeria monocytogenes* y *Bacillus cereus* (Ghasemi *et al.*, 2010). Estos mismos aceites esenciales de *S. bachtiarica* resultan ser activos también en microorganismos patógenos de peces, como el *Streptococcus iniae*, y frente al protozoo responsable de la leishmaniasis (Mohammadpour *et al.*, 2012).

El aceite esencial de *S. khuzestanica* protege el sistema reproductor de ratas frente a la toxicidad de la ciclofosfamida, agente alquilante utilizado en la terapia anticancerígena, y protege de la cistitis hemorrágica producida como consecuencia de la generación de ROS (Rezvanfar *et al.*, 2008; Rezvanfar *et al.*, 2010). También se ha descrito actividad antidiabética en el aceite esencial de *S. khuzestanica*, que parece ser

que esta mediada por su potencial antioxidante (Basiri *et al.*, 2007). Los extractos hidroalcohólicos de esta especie y el aceite esencial también poseen efectos antiinflamatorios similares a *prednisolona*, *indometacina* y *morfina*, utilizados como sustancias de referencia (Amanlou *et al.*, 2005; Ghazanfari *et al.*, 2006; Shahab *et al.*, 2011). Un estudio randomizado y controlado por placebo, ha puesto de manifiesto actualmente que la especie *S. khuzestanica*, aplicada en enfermos de colitis ulcerosa, una enfermedad inflamatoria intestinal crónica, presentan menor rebrote de la enfermedad; es decir, alcanzaban la remisión mayor cantidad de pacientes frente a placebo (Rastegarpanah *et al.*, 2011). El ensayo clínico se realizó con cápsulas de hojas desecadas de la planta (500 mg). El extracto hidroalcohólico de *S. khuzestanica* también presenta actividad *in vitro* frente al *Echinococcus granulosus*, el parásito responsable de los quistes hidatídicos (Zibaei *et al.*, 2012).

El aceite esencial de *S. spicigera*, también presenta actividad antibacteriana frente a bacterias Gram + como *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus* (Eftekhari *et al.*, 2009). Se han aislado e identificado varios compuestos en esta especie, como flavanonas, chalconas (nubigenol) y terpenos (Gohari *et al.*, 2012). De ellos, solamente un heterósido flavanónico, el 5,4'-dihidroxi-3'-metoxyflavanona-7-(6''-O- α -L-ramnopiranosil)- β -D-glucopiranosido, resulta activo frente a líneas celulares humanas cancerígenas (CI₅₀ de 98,7 μ g/mL).

Una especie de origen serbio, la *S. kitaibeli*, también proporciona un aceite esencial con actividad antimicrobiana frente a microorganismos contaminantes de alimentos (Concentración Mínima Inhibitoria, CMI entre 0,18-25,5 μ g/mL), bacterias multiresistentes (CMI entre 6,25-50 μ g/mL) y hongos (CMI 12,5-50 μ g/mL) (Kundakovic *et al.*, 2011; Mihajilov-Kistev *et al.*, 2011).

De especies americanas del género hay referencia a *S. parviflora*, una planta medicinal de la provincia argentina de San Juan, cuyo aceite esencial tiene actividad antifúngica frente a *Microsporum gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes* y *Trichophyton rubrum* (CMI entre 31,2-1000 μ g/mL) (Lima *et al.*, 2011).

S. macrostema Benth. es una planta utilizada como alimento funcional en México. El extracto metanólico de esta planta presenta propiedades hepatoprotectoras, muy probablemente debido a su acción antioxidante (Pérez & Gutiérrez, 2010).

Con respecto a nuestra especie, la *S. boliviana*, solamente hemos encontrado referencias acerca de su posible actividad protectora gástrica (Gonzales *et al.*, 2000), y de la actividad antiviral de sus extractos acuosos frente VHS-1 y VSV, demostrada por nuestro grupo (Abad *et al.*, 1999).

De acuerdo con la revisión hecha hasta el momento en el género, las investigaciones se inclinan en la actividad antibacteriana, dejando en segundo término otros efectos biológicos importantes y prometedores como son antifúngicos, antivirales, antioxidantes, antiinflamatorios, antidiabéticos, vasodilatadores y analgésicos. Desde el punto de vista químico, las investigaciones se centran en estudiar los aceites esenciales, sin elucidar otros compuestos posiblemente responsables también de muchos de estos efectos. En el presente trabajo, tratamos de elucidar otros compuestos distintos de los aceites esenciales y estudiar otros efectos farmacológicos.

Género *Phoradendron*

7.7 Estudio botánico *Phoradendron*

El género *Phoradendron* Nutt. pertenece a la familia *Loranthaceae*, que comprende siete u ocho géneros, y unas 1400 especies leñosas, raramente herbáceas, epífitas, y parásitas o semiparásitas de árboles. Carecen de verdadero aparato radial, pero emiten unos haustorios, que las fijan a la planta que van a parasitar, a la vez que les permiten la absorción de la savia bruta.

7.7.1. Taxonomía

La clasificación taxonómica, según Cronquist (1981), es:

División	<i>Magnoliophyta</i> (Angiospermas)
Clase	<i>Magnoliopsida</i> (Dicotiledóneas)
Subclase	<i>Rosidae</i>
Orden	<i>Santalales</i>
Familia	<i>Loranthaceae</i>
Género	<i>Phoradendron</i> Nutt.
Especie	<i>Phoradendron crassifolium</i> Eichl.

7.7.2. Morfología y descripción botánica

El género *Phoradendron* es estrictamente americano; reúne 300 especies y comprende plantas que viven parásitas, sobre todo en órganos aéreos de dicotiledóneas. Curiosamente, éste género no sufre a su vez el ataque de insectos o de otras plantas parásitas.

Pueden presentar un colorido amarillento, dorado, de tallos quebradizos, y pseudodicotomo. Las hojas son opuestas, pecioladas o no, y en algunas especies reducidas a escamas. El fruto es en bacata, de formas diversas y de color blanco, amarillento e incluso rojizo. Las flores son dioicas o monoicas, en espigas unisexuales,

aunque lo más habitual es encontrar flores estaminadas y pistiladas en la misma espiga. Excepto un pequeño grupo, son todas glabras.

Destacan en Bolivia las siguientes especies del género *Phoradendron*:

- *Phoradendron angustifolium* Eichler
- *Phoradendron bathyoryctum* Eichler
- *Phoradendron bolivianum* n.s.p.
- *Phoradendron brittonianum* Rusby
- *Phoradendron crassifolium* Eichler
- *Phoradendron kuntzei* (Urban)
- *Phoradendron liga* Eichler
- *Phoradendron mandonii* Eichler
- *Phoradendron meliae* n.s.p.
- *Phoradendron semiteres* n.s.p.
- *Phoradendron undulatum* Eichler



Figura 61. *Phoradendron crassifolium* (Pohl ex DC.) Eichler [9166-781219-33114] Flora Brasiliensis, vol. 5(2): Heft 44, Heft 44, t. www.plantillustrations.org

La especie *P. crassifolium*. es una especie siempre glabra, ocasionalmente pseudodicotoma, y con catafilos en todos sus nudos, los cuales están bastante separados entre sí. Los tres o cuatro pares de catafilos inferiores son estériles, y los superiores generalmente caducos y fértiles. Las hojas son largas, ovadas, más o menos lanceoladas, obtusas o despuntadas, redondeadas en la base, gruesas y basinervadas. Las espigas son algunas veces terminales, además de axilares, y ocasionalmente forman una inflorescencia terminal compuesta, derivada de la supresión de las hojas cerca del ápice, a menudo agrupados, con unos cinco nudos decafloreados en 4+2 ó seis series; los pedúnculos son de 5 mm de largo, a menudo con cinco pares de escamas. Fruto subgloboso, amarillento, ligeramente granuloso, con unos 4 mm. de diámetro, con sépalos soldados.



Figura 62 y 63. *Phoradendron crassifolium* parasitando *tapiria guianensis* (Anacardiaceae). www. inaturalist.org, www.phytoimages .siu.edu.

En la bibliografía aparece bajo otros sinónimos:

- *Phoradendron crassifolium* Urban.
- *Phoradendron pepericarpum* A. Gray.

- *Viscum crassifolium* Pohl.

Nombres comunes: “muérdago americano”; en Bolivia: “solda solda”, “sacha pupa”, “chunku chunku” (Girault, 1987; Oblitas, 1992).

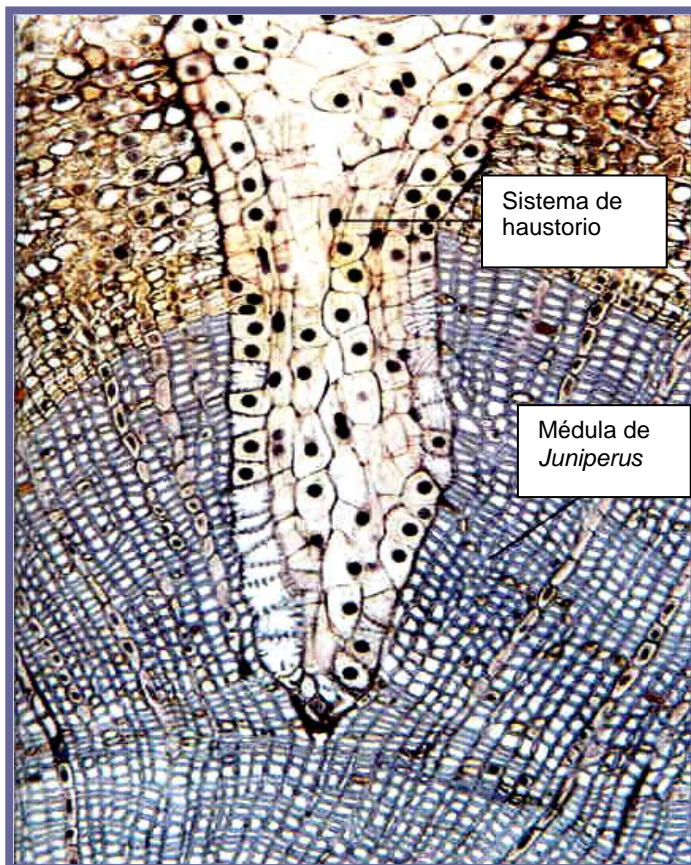


Figura 64. Sección transversal de un tronco de *enebro* atacado por el haustorio (raíz modificada) de *Phoradendron*. . Gomez-Sanchez *et al.*, 2011.

Es importante destacar en éste tipo de plantas parásitas, y en particular en ésta especie, su sistema radicular, que en éstos casos aparece modificado y es llamado “haustorio”. No obstante, el sistema típico haustorio debe adherirse firmemente a su huésped mediante la secreción de un adhesivo, o abrazando una pequeña ramificación o raíz.

La penetración se produce forzando un haz de células a introducirse en el sistema dérmico, rompiendo la epidermis del huésped. Después de la penetración, nacen unos apéndices suctores cónicos, que hacen contacto con el xilema del huésped, y toman agua y sales nutritivas de él.

En muchos casos, las células de huésped y parásito se dividen y proliferan en una masa irregular de parénquima, y entonces una columna de células diferenciales introduce una serie de vasos elementales.

7.8. Estudio fitoquímico *Phoradendron*

Se han encontrado muy pocas referencias sobre la composición química de éste género. Se han identificado en los frutos de algunas especies del género, proteínas y lectinas, que son glicoproteínas de origen no inducido, capaces de fijarse de forma específica y reversible a los residuos osídicos de las membranas celulares, sin mostrar actividad enzimática. Por ello, los frutos de estas especies resultan tóxicos.

7.9. Actividad farmacológica y usos terapéuticos tradicionales

El género *Phoradendron* ha sido usado en medicina popular para el dolor de cabeza, como antiinflamatorio, y en el tratamiento de tumores epiteliales (Stein *et al.*, 1998). En

medicina popular brasileña algunas especies de *Phoradendron* se usan para desordenes femeninos, gastrointestinales, para el dolores reumaticos, gripe y como vermífugo (Agra *et al.*, 2007; Dias *et al.*, 2007). En Venezuela, el *P. crassifolium* se utiliza para bajar la fiebre a los niños, por vía externa, previa decocción de la corteza. En Bolivia, las hojas y los tallos en decocción a dosis elevadas, se usan para el tratamiento de hemorragias provocadas por “desgarres internos”; a pequeñas dosis, para regularizar el flujo menstrual; en infusión, para dolores reumáticos, expulsión de arenillas de riñones, vejiga y uretra; en cataplasma, para el dolor de cabeza, dolor reumático, fracturas y como antiinflamatorio (Girault, 1987; Oblitas, 1992 ; Muschietti *et. al.*, 1996).

Se han encontrado estudios acerca de la toxicidad que produce la ingestión de los frutos de algunas especies de este género, toxicidad que produce graves trastornos. Esta toxicidad se suele producir de manera accidental, especialmente en niños, al confundir los frutos de estas especies con otros frutos comestibles, consumidos especialmente en épocas navideñas. Esta toxicidad es debida a la presencia de proteínas y lectinas tóxicas. Este es el caso del *Phoradendron flavescens* Nutt., produce toxicidad, con trastornos gastrointestinales, leve somnolencia, irritación ocular, ataxia, y ataques de apoplejía. (Spiller *et al.*, 1996). Otras especies de *Phoradendron* tóxicas son especies mexicanas, como *Phoradendron seratinum* (Raf.) M.C. Johnst., que produce transtornos gastrointestinales leves, pero grave afectación a nivel del sistema nervioso central con temblores y alucinaciones, y *Phoradendrom tomentosum* (DC.) Engelm. ex A. Gray (Calzado *et al.*, 2002 ; Courtemanche & Peterson, 2006).

Sin embargo, algunos compuestos aislados del género *Phoradendron*, entre ellos algunas toxinas, se han reportado su actividad antitumoral. Este es el caso de la ligatoxina B identificada en la especie argentina *P. liga*, una nueva proteína que es capaz de unirse al DNA; estos resultados sugieren que la apoptosis celular sea iniciada a través de esta unión (Li *et al.*, 2002). Se ha descrito que una lectina contenida en el extracto de esta especie, esta estrechamente relacionada con la actividad inmunomoduladora y efectos antitumorales del mismo, y algunos extractos han sido estandarizados de acuerdo con su concentración en lectina. (Braun *et al.*, 2002). La especie americana *Phoradendron californicum* Nutt., también posee una glicoproteína con actividad citotóxica; su mecanismo de acción se basa en poseer una actividad RNA N-glicosidasa. (Endo *et al.*, 1989).

La especie *P. tomentosum*, responsable de intoxicaciones por ingestión accidental de sus frutos, proporciona proteínas (phorotoxinas), con actividad antitumoral en líneas celulares tumorales humanas (Johanson *et al.*, 2003). Otros compuestos citotóxicos

identificados en el género *Phoradendron* son de naturaleza triterpénica, como los aislados en la especie *Phoradendron reichenbachianum* (Seem.) Oliv. (ácido morónico y el ácido 3,4-seco-olean-18-eno-3,28-dioico (Ríos et al., 2001). Recientemente, también se ha detectado buena actividad antitumoral con extractos de la especie mexicana *P. seratinum*, frente a células HeLa y MCF7 (Jacobo-Salcedo, M., et al., 2011).

Se han detectado además propiedades antiinfecciosas en especies del género *Phoradendron*, y compuestos aislados de ellas. Este es el caso del flavonoide sakuretina aislado del *Phoradendron robinsonii* Trel., con propiedades antituberculosas (Rivero et al., 2005), y triterpenos como el ácido oleanólico aislado del *Phoradendrom juniperinum* Engel, que inhibe poderosamente la replicación del VIH (Kashiwada et al., 1998). Este compuesto inhibe la replicación de VIH-1 en infección aguda de células H9, con un valor de Concentración Eficaz 50 (CE₅₀) de 1,7 µg/mL, e inhibe el crecimiento de células H9 con una CI₅₀ de 21,8 µg/mL.

Se ha descrito también actividad antiinflamatoria, administrado por vía oral, del extracto metanólico de *Phoradendron piperioides* (Kunth) Trelease, reduciendo el edema producido por carragenina un 28% (200 mg/mL), y actividad antioxidante del extracto metanólico, diclorometánico y de acetato de etilo (94,5, 37,2 y 77,2%, respectivamente) (Vasconcellos et al., 2009).

Con nuestra especie, *P. crassifolium*, se ha descrito actividad protectora gástrica con su infusión, y actividad frente al VHS-1 (Gonzales et al., 2000; Abad et al., 1999).

MATERIAL Y MÉTODOS

Material Vegetal

1. PREPARACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

1.1 Recolección

Las especies vegetales bolivianas utilizadas en éste trabajo, *Satureja boliviana* y *Phoradendron crassifolium*, fueron recolectadas por el Dr. Eduardo Gonzales Dávalos, profesor en la Facultad de Farmacia de la Universidad Mayor de San Andrés, La Paz, entre los meses de Octubre y Marzo, en el Departamento de la Paz (Bolivia) coincidiendo con la época de floración.

Los ejemplares de herbario de los especímenes fueron depositados en la Facultad de Farmacia, Universidad Mayor de San Andrés, La Paz, Bolivia con los números, 163-E y 159-E, respectivamente.

Respecto a la especie vegetal española *Tuberaria lignosa* fue recolectada en Arenas de San Pedro, Ávila, reconocida y debidamente clasificada por el Dr. José Antonio Molina profesor del departamento de Biología Vegetal II de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid. Se depositó pliego testigo de la especie en el Herbario de la Facultad de Farmacia con el número, MAF 136040, Universidad Complutense de Madrid.

1.2 Dsecación

Para evitar todo tipo de alteración sobre las especies vegetales de modo que pudiera afectar a la composición, la droga fue extendida inmediatamente en una habitación ventilada, a una temperatura próxima a los 18-20°C, evitándose al mismo tiempo la exposición directa a la luz solar.

1.3 Molturación

En todos los casos se separaron las partes aéreas, las cuales fueron pulverizadas en molino (Royal Triumph), hasta conseguir un tamaño de partícula adecuado. El material molturado se almacena adecuadamente en un lugar desprovisto de humedad y luz directa, hasta su posterior utilización.

El material vegetal desecado y pulverizado se guardó en botes, limpios, cerrados y protegidos de la luz y de la humedad.

2. BASES DE LA IDENTIFICACIÓN MICROGRÁFICA

Antes de emplear una droga en terapéutica, es necesario realizar ensayos que permitan su identificación, detectar posibles adulteraciones y observar su posible

estado de conservación para que su empleo se realice con calidad y seguridad, pues de ello dependerá su eficacia.

En este trabajo se procedió a realizar ensayos botánicos microscópicos al tratarse de una droga pulverizada. Al no disponer de droga entera no se realizaron ensayos de identificación histológicos.

2.1. Ensayos micrográficos: Consiste en observar al microscopio los contenidos celulares y los elementos celulares de valor diagnóstico que son característicos de una droga pulverizada y que sirven para identificarlos.

Material:

- Portaobjetos y cubreobjetos
- Lanceta
- microscopio
- Reactivos de coloración y aclarado:
 - Agua de Yodo, que tiñe la fécula color azul oscuro- negro
 - Hidrato de Cloral, reactivo aclarante, cuando queremos observar contornos celulares, se deja actuar durante unos minutos antes de la observación microscópica, de tal forma que va disolviendo poco a poco los colorantes de las paredes celulares.
 - Fluoroglucina Clorhídrica, (solución de floroglucina en alcohol al 50% con CIH concentrado), para observar elementos lignificados como los sistemas conductores, es decir, vasos y también para sistemas de resistencia como células pétreas y fibras.
 - Cloroyoduro de Zinc, que tiñe elementos celulósicos como epidermis, pelos y estomas
 - Sudan III, para grasas y esencias

Método:

Sobre un portaobjetos perfectamente limpio se depositaron dos gotas de reactivo a emplear, se añadió sobre el reactivo una pequeña cantidad de la droga pulverizada y se procedió a homogeneizar, se colocó el cubreobjetos en ángulo para evitar la entrada de aire en la muestra, y se colocó en el microscopio para la observación.

Tratándose de la sumidad florida podremos encontrar:

- Elementos celulares: celulósicos: epidermis con estomas y pelos o tricomas y glándulas, lignificados: vasos que son de conducción o fibras y células pétreas de resistencia. Granos de polén
- Contenidos celulares: elementos de naturaleza oleosa, cristales y gotas de esencia.

3. PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS

La primera extracción que hemos realizado ha sido la obtención de un extracto acuoso y de un extracto etanólico.

3.1. Extracto acuoso

Se preparó por infusión, para ello se partió de 10g de material vegetal pulverizado en 100mL de agua a 100°C durante 30 min, según la Real Farmacopea Española (1997), con posterior filtración y liofilización. Se denominó con la letra A.

3.2. Extracto etanólico

La extracción se realizó por maceración en frío con etanol de 95° hasta líquidos alcohólicos claros.

Se partió de 10g. de material vegetal pulverizado y 100mL de Etanol absoluto, dejando 30min en agitación a temperatura ambiente.

Los líquidos alcohólicos se concentraron a presión y temperatura reducida, temperatura siempre inferior a 40°, en rotavapor. Se denominó con la letra B.

Material

Los líquidos acuosos se recogieron en frascos de liofilizar preparados para soportar la baja presión y temperatura que conlleva el proceso de liofilización y se congelaron a una temperatura de -20°C. Posteriormente se conectaron al liofilizador (FTS system) durante 3 días.

El liofilizado se conservó en frascos de cristal opacos a 5°C, protegidos de la humedad.

Los líquidos alcohólicos se evaporan hasta residuo en a presión y temperatura controlada en rotavapor. Se conservó en frascos de cristal opacos a 5°C.

En principio, la elección de los extractos y del proceso de fraccionamiento queda ligado a los resultados de actividad que nos proporcionan los ensayos antivirales.

4. FRACCIONAMIENTO DE LOS EXTRACTOS ACTIVOS

Material

- Tubos de centrifuga Falcon de 50 mL.
- Centrifuga SORWALL RT 6000D.
- Eppendorfs

Método

Los liofilizados acuosos activos se sometieron a un proceso de precipitación con alcohol de 70°, de tal forma que se fraccionaron en dos:

- ❖ Fracción soluble en alcohol de 70°, denominados con las siglas A0
- ❖ Fracción insoluble en alcohol de 70°, denominado con las siglas A1

Se procedió a centrifugación con centrifuga (SORWAL RT 6000D) a 6000 rpm durante 10 min aprox. El proceso de precipitación se repitió varias veces, hasta líquidos alcohólicos incoloros.

La primera fracción, es decir la fracción soluble en alcohol se decantó sobre un matraz de fondo redondo para concentrarlo en rotavapor a presión y temperatura reducidas y la segunda fracción, es decir la fracción insoluble en alcohol se desecó para eliminar los restos de disolvente. Una vez obtenidas las dos fracciones, convenientemente desecadas, se pesaron y se recogieron en frascos previamente tarados. Los extractos se conservaron a 5°C de temperatura.

Una vez realizadas las diluciones para el ensayo de actividad antiviral éstas se conservaron a -20°C.

4.1. Diálisis

La diálisis la hemos ido utilizando durante todo el proceso, para separar, purificar y eliminar sales de los extractos en unos casos y de los polisacáridos en otros.

Es un método de filtración a través de una membrana con un tamaño de poro determinado, normalmente la hemos utilizado en extractos que son solubles en agua o que precipitan en alcohol como es el caso de los polisacáridos, y la hemos realizado contra agua o contra alcohol y en algunos casos contra una solución de alcohol al 50%.

Material

- Membranas de diálisis Visking. Exclusión de peso molecular 12-14 kDa. Medicell Internacional Ltd.
- Agua destilada y alcohol 96°
- HNaCO₃ 2M y EDTA 10 mM
- Erlenmeyers de 500 mL, 5000 mL
- Agitador magnético

Método

Activamos las membranas con una solución de HNaCO₃ 2M y EDTA 10mM a 80°C durante una hora. Lavamos las membranas y rellenamos con la muestra diluida en agua o en alcohol cerrándola e introduciéndola en agua destilada o alcohol que se va regenerando durante varios días dependiendo de los casos.

4.2. Reacción con CETAVLON®

Seguimos el método propuesto por Zhang y cols. (Zhang, 1997). Este método se fundamenta en la separación de la fracción glucídica en base a la acidez de la molécula. Se basa en que los polisacáridos fuertemente ácidos, como la pectina o el ácido algínico, precipitan al añadir a la solución sales de amonio cuaternario, por lo

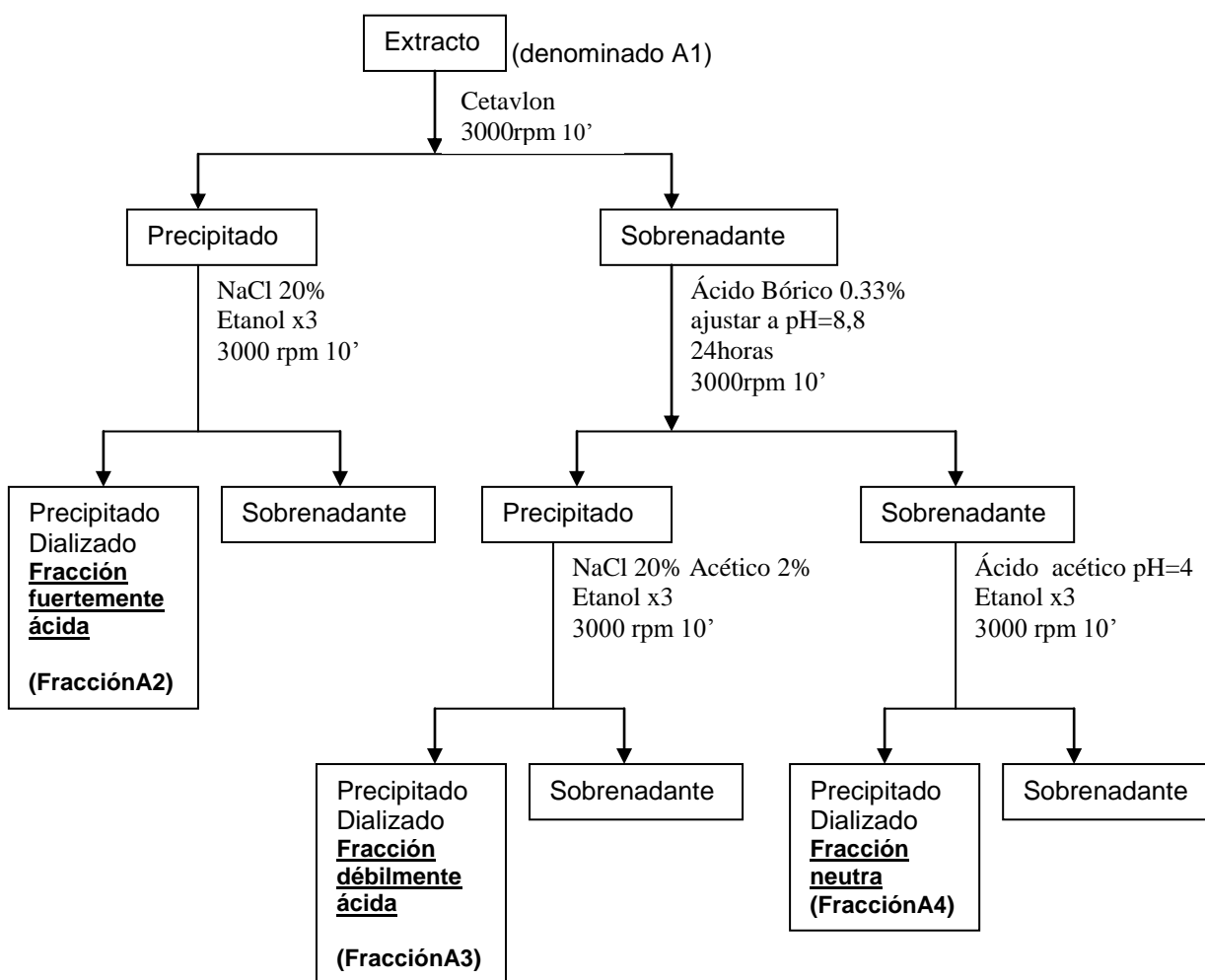
que podemos separarlos de los neutros. La sal de amonio utilizada fue el bromuro de cetiltrimetilamonio o Cetavlon®.

Material

- Cetavlon® (Bromuro de hexadeciltrimetil amonio). Sigma.
- NaCl. PRS. Panreac.
- Etanol 96°. PRS. Panreac.
- Acido bórico. PRS. Panreac.
- Acido acético glacial. QP. Panreac.
- Membranas de diálisis Visking de 12-14Kda. Medicell Internacional ltd.

Método

La muestra se dializa contra agua y la fracción no dializable es redisuelta en agua, añadiéndose el reactivo Cetavlon®. Se deja precipitar durante 6 horas a 20°C y se centrifuga a 3000 rpm 10min. y el precipitado se redisuelve en agua y se dializa. Ésta será la fracción fuertemente ácida que denominamos como SBA2, TLA2 y PCA2.



En el sobrenadante estarán los polisacáridos menos ácidos. Ésta fracción se separa por adición de ácido bórico y posteriormente ajuste del pH a 8,8. Se deja 24 horas y se centrifuga a 3000 rpm 10 min. Separamos el precipitado del sobrenadante.

El sobrenadante se precipita a su vez con tres volúmenes de etanol, se centrifuga y el precipitado se redisuelve en agua y se dializa, siendo ésta la fracción neutra, que denominamos como SBA4, TLA4 y PCA4.

El precipitado es redisuelto en una solución al 20% e NaCl en medio ácido (Ácido acético al 1%), se precipita con tres volúmenes de etanol y se centrifuga.

El precipitado se redisuelve en agua y se dializa. Ésta será la fracción débilmente ácida, que denominamos como SBA3, TLA3 y PCA3.

Todas las diálisis se realizan contra agua.

Purificación de las fracciones: A continuación se procedió a la purificación de las fracciones, para ello se trataron con NaOH 1M y en agitación durante 2h con el fin de obtener el polisacárido lo mas puro posible y así eliminar restos de proteínas y lípidos. Posteriormente, y con el objeto de precipitar los polisacáridos, se añadió un volumen de etanol 96% y se dejó toda la noche a temperatura ambiente. El precipitado se recogió por centrifugación, se resuspendió en agua y se dializó durante 4 días frente a agua en una membrana 12-14 kDa para eliminar el NaOH y todas las moléculas con un tamaño inferior al del corte de la membrana. Tras centrifugar el material dializado, se obtuvieron dos fracciones: una soluble (S) que se concentró en rotavapor y una insoluble (I). Las fracciones que fueron congeladas y liofilizadas.

<u>Fracciones</u> <u><i>Satureja boliviana</i></u>	<u>Fracciones</u> <u><i>Tuberaria lignosa</i></u>	<u>Fracciones</u> <u><i>Phoradendron crassifolium</i></u>
SBA2-I	TLA2-I	PCA2-I
SBA2-S	TLA2-S	TLA2-S
SBA3-I	TLA3-I	PCA3-I
SBA3-S	TLA3-S	PCA3-S
SBA4-I	TLA4-I	PCA4-I
SBA4-S	TLA4-S	PCA4-S

Tabla 2. Fracciones soluble e insoluble tras purificación con NaOH y Etanol.

5. ANÁLISIS PREVIOS

5.1. Determinación de SUSTANCIAS FENÓLICAS

Se realizan una serie de reacciones características de los grupos químicos para comprobar la existencia o ausencia de los mismos en nuestra sustancia activa.

Reacción con sales de hierro (Fe Cl_3) y nitrito sódico (NaNO_2)

Se realiza esta reacción con tricloruro de hierro (Fe Cl_3) al 1% en metanol.

Se provoca la reacción de análisis con nuestras muestras problema y como sustancia de referencia un patrón interno.

A la muestra disuelta en agua le añadimos la solución de Fe Cl_3 . La formación de coloración verde o azul indica la presencia de sustancias fenólicas.

A la muestra disuelta en agua le añadimos una solución NaNO_2 (0,1%) en agua a 4°C. La formación de coloración naranja indica la presencia de ácido elágico.

5.2. Reacción de STIASNY

Este reactivo está formado por HCl y formaldehído al 30%. En este medio ácido los taninos gálicos se hidrolizan y se solubilizan como ácido y azúcar. Los taninos catéquicos no se hidrolizan y en presencia de formol forman polímeros que precipitan en forma de masas algodonosas denominadas flobáfenos. Es una reacción específica de taninos catéquicos.

Al extracto acuoso se le añade el reactivo de Stiasny llevando al baño María durante 30min. En el caso de ser positiva aparecerán masas marrón oscuras (flobáfenos).

5.3. Reacción de la CIANIDINA

Esta reacción se basa en la reducción de los flavonoides a antocianidinas por la acción del hidrógeno desprendido al hacer reaccionar virutas de Mg o Zn con HCl. Estas reducciones van acompañadas de cambios de color en las soluciones, que van desde el rosa hasta el violeta. Se diluye la muestra en agua y etanol 96° y a continuación se añade magnesio en virutas y tratamos con HCl 1/3. Los cambios de coloración se producen en el momento.

5.4. Determinación de PROTEÍNAS TOTALES por LOWRY (Peterson, G.L., et al (1983)

Solución A (100mL): 0,5 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ + 1 g $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Se añade agua destilada hasta 100mL. Esta solución puede almacenarse indefinidamente a temperatura ambiente.

Solución B (1L): 20 g NaCO_3 + 4 g NaOH . Se añade agua destilada hasta 1L. Esta solución puede almacenarse indefinidamente a temperatura ambiente.

Solución C (51mL): 1 mL de solución A + 50 mL de solución B

Solución D: 10 mL "Folin-Ciocalteu phenol reagent"+ 10 mL de agua destilada

Método:

Se llevar la muestra hasta un volumen de 0,3mL (con agua destilada). Se añade 1,5mL de solución C. Se agita en vortex y se incuba a temperatura ambiente 1 min. Se añaden 0,15 mL de solución D y se agita en vortex. Se espera de 20-30 min y se procede a leer a $\lambda=750$ nm. Rango de sensibilidad 5-100 μ g/mL.

6. PURIFICACIÓN DE LOS EXTRACTOS

Se parte de 1 g del extracto insoluble en etanol y liofilizado, se trata con 200 mL de NaOH 1M durante 2 horas en agitación, con el fin de extraer todo el material soluble en esas condiciones, solubilizar las proteínas que puedan quedar. Posteriormente y con el objeto de precipitar los polisacáridos se añade un volumen de etanol 96% que se deja toda la noche a temperatura ambiente. El precipitado se recoge por centrifugación, se dializa durante 4 días contra agua en una membrana 12-14000 Da para eliminar tanto el NaOH como cualquier molécula con un tamaño inferior a 14 kDa. Se obtienen dos fracciones, una soluble y otra insoluble, la parte soluble se concentra en rotavapor. Las fracciones solubles (S) e insolubles (I) de los tres extractos vegetales, denominadas TLAs, TLAI, SBAs, SBAI, PCAs y PCAI, fueron congeladas y liofilizadas para su posterior análisis.

7. FRACCIONAMIENTO, SEPARACION y CARACTERIZACIÓN DE LOS POLISACÁRIDOS

7.1. CROMATOGRAFÍA

La cromatografía es actualmente uno de los métodos más utilizados para la separación de compuestos ya que permite separar mezclas complejas con gran precisión. Puede purificar casi cualquier sustancia soluble o volátil, si el material adsorbente, solventes y condiciones de trabajo son las adecuadas.

7.1.1. Cromatografía en capa fina o CCF

Es una técnica utilizada para separar compuestos orgánicos. Su simplicidad y rapidez hacen de ella una técnica indispensable en la determinación de la complejidad de la muestra, la monitorización de las separaciones a mayor escala y en la determinación de la pureza de los productos.

Se realiza en una placa que suele ser de plástico, metal o cristal, recubierta de un sólido adsorbente (sílice, celulosa o alúmina) que es la fase estacionaria. Un solvente apropiado actúa como fase móvil y para el análisis es suficiente con un pequeño depósito de la muestra sobre la fase estacionaria, cerca de la parte inferior de la placa.

Para mejorar la identificación de los compuestos es importante depositar junto a la muestra y en la fase estacionaria sustancias de referencia o patrón. La fase móvil asciende por capilaridad a través de la fase estacionaria hasta alcanzar la parte superior de la placa lo que se denomina frente de elución. La separación de los diferentes compuestos de la mezcla problema se realiza en función de su solubilidad en la fase móvil y de su mayor o menor adsorción sobre la fase estacionaria, por lo que los compuestos mas fuertemente adsorbidos y los menos solubles en la fase móvil necesitarán mas tiempo para ascender. En base al frente de elución se calcula el factor de retención (*retention factor, R_f*), que en las mismas condiciones será el mismo para cada molécula.

La fuerza con que un compuesto orgánico se une a la fase estacionaria depende de interacciones tipo ion-dipolo, dipolo-dipolo, puentes de hidrógeno, dipolo inducido y fuerzas de Van der Waals. En el presente estudio utilizamos la sílice como fase estacionaria, cuyas interacciones predominantes son las fuerzas dipolo-dipolo. Las moléculas mas polares interaccionaran con los enlaces Si-O, y entonces su retención será mayor.

Si los compuestos no son coloreados se recurre a la observación bajo luz UV o bien al empleo de reveladores específicos.

Hidrólisis

- Cromatoplasas AL TLC de Sílica–gel 60, 20x20cm. Merck
- TFA concentrado (Panreac)

Fases móviles

- Propanol : acetato de etilo : agua (40:50:10) con revelador HCl-resorcinol.
 - Acetona : agua, (87:13) con la misma sustancia reveladora que anteriormente.
 - Acetato de etilo : acético : metanol : agua, (60:15:15:10) revelador HCl-resorcinol y timol sulfúrico (mejor).
 - Acetato de etilo: piridina: agua (2:1:2) que se revela con ftalato de p-anisidina
 - Acetato de etilo: acético: metanol: agua . (18:4,5:4,5:3), que se revela con timol sulfúrico.
 - Ácido acético: piridina: agua, (2:1:2) revelador ftalato de p-anisidina

7.1.2. Cromatografía de exclusión molecular o SEC (size exclusion chromatography)

La cromatografía de exclusión por tamaño utiliza un gel poroso que separa las moléculas en función de su volumen hidrodinámico. Los poros son normalmente pequeños y excluyen a las moléculas más voluminosas, dejando penetrar a las moléculas de menor tamaño, que quedan más retenidas en el gel. Las moléculas de mayor tamaño eluirán antes ya que no son capaces de penetrar en los poros.

En nuestro caso, se utilizó la filtración en gel para comprobar si las fracciones solubles estaban constituidas por un solo polisacárido o si eran una mezcla de varios y en su caso, tratar de separar los distintos polímeros que la formaban en función de las diferencias de tamaño y forma de sus componentes. Se utilizó gel de *Sepharose* CL-6B (40 cm x 2,6 cm) que retiene polisacáridos con pesos moleculares comprendidos entre 10^6 y 10^4 Da. Se empleó como eluyente NaOH 0,3M, o H_2O . La homogeneidad del empaquetamiento y el calibrado de la columnas se realizó cargando una mezcla de azul dextrano (P_m medio= $2 \cdot 10^6$ Da), dextrano T500 (P_m medio= $5 \cdot 10^5$ Da), dextrano T70 (P_m medio= $7 \cdot 10^4$ Da) y vitamina B_{12} (P_m = 1355 Da).

Unos 22 mg de cada fracción soluble se resuspendieron en 2 mL de NaOH 0,3M, o en 2 mL de H_2O , centrifugando en una centrífuga Microfuge durante 15 minutos a la máxima velocidad para eliminar precipitados. La disolución obtenida se cargó en la columna, se utilizó un flujo de eluyente de $24 \text{ mL} \cdot \text{h}^{-1}$. Se recogieron fracciones de 3,7 mL monitorizando rutinariamente su contenido en carbohidratos por el método del fenol sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956). Las fracciones apropiadas se juntaron y concentraron, después se dializaron, congelaron y liofilizaron para su posterior análisis.

7.2 ANÁLISIS QUÍMICO

7.2.1. Valoración de Carbohidratos totales

La cuantificación de carbohidratos neutros totales se realizó por dos métodos:

Método del FENOL SULFÚRICO (Dubois *et al.*, 1956)

Fundamento:

En presencia de ácido sulfúrico concentrado, los azúcares con grupos reductores (aldehído o cetona) se deshidratan dando lugar a derivados del furfural, que se condensan con fenoles generando complejos coloreados naranja-amarillento.

En las fracciones eluidas de la columna de filtración en gel se determinaron carbohidratos totales tomando:

- 50 μL de muestra
- 250 μL fenol al 5% en agua
- 1.25 mL H_2SO_4 concentrado

Se agita y se lee absorbancia a 485nm frente a un blanco con agua, Como patrón se utiliza glucosa a tres concentraciones distintas, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

En el caso de utilizar como disolvente y eluyente NaOH 0,3M, el blanco será entonces NaOH 0,3M.

Método de la ANTRONA (Loewus, 1952)

Se basa en la hidrólisis de los carbohidratos con ácido sulfúrico concentrado en caliente y en la deshidratación ulterior de los monosacáridos liberados previamente por la hidrólisis. Las pentosas dan lugar a furfural, y las hexosas a 5-hidroximetil-2-furfural, que reaccionan con los grupos fenólicos de la antrona para dar lugar a compuestos coloreados, cuya intensidad de color es proporcional a la cantidad de carbohidratos presentes en la muestra.

Reactivos:

- Solución de antrona al 0,2% en ácido sulfúrico concentrado (p/v), que se añade en frío y agitando (la solución es inestable y se prepara en el momento de ser utilizada).

Procedimiento:

La muestra a analizar, que contiene entre 20 y 200 µg de carbohidratos, se completa con agua hasta 1,5 mL. A continuación se añaden 3 mL del reactivo en frío, agitando. Inmediatamente después se introduce en un baño con agua hirviendo durante 10 minutos, se deja enfriar, y se mide la absorbancia a 540 nm, frente a un blanco (glucosa 50µg/ mL, 100µg/ mL y 150µg/ mL).

7.2.2. Determinación de la composición de ácidos urónicos**Método del CARBAZOL** (Bitter & Muir, 1962)

Al hidrolizar la muestra con ácido sulfúrico concentrado se originan compuestos intermediarios (principalmente ácido 5-formil furóico) que todavía conservan su carbono carbonilo. Éste reacciona con el carbazol y da un color rosa que es proporcional a la cantidad de ácido urónico que se encuentre en la muestra.

**Reactivos:**

- Ácido sulfúrico concentrado.
- Solución de carbazol al 0,1% en etanol (1 mg/mL).

Procedimiento:

La muestra (conteniendo 50 a 500 µg de ácidos urónicos) se completó a 0,5 mL con agua destilada. A continuación se añadieron 3 mL de ácido sulfúrico concentrado en frío, se agita y se calienta en un baño de agua hirviendo durante 15 min. La mezcla se enfrió con agua del grifo. Se añade 0,1 mL de carbazol, agitando y se deja reaccionar

2 horas. El color aparece a los pocos minutos de añadir el carbazol y disminuye de intensidad progresivamente hasta perder el color definitivamente a las 24 horas. Se midió la absorbancia a **525 nm** frente a un blanco. La absorción debida a los azúcares neutros (aprox. 10% para hexosas) se dedujo colocando un estándar de azúcar en la determinación. Para construir la curva patrón se utilizó galacturónico 10-100 µg/mL. Diferentes ácidos urónicos originan diferentes respuestas.

Patrón 200 µg/mL	Ac. Glucurónico A ₅₃₀	Ac. galacturónico A ₅₃₀
100 uL (20 ug) + 400 agua	.192	0.363
200 uL (40 ug) + 300 agua	.443	0.698
400 uL (80 ug) + 100 agua	.826	1.380

7.3. ANÁLISIS ESTRUCTURAL

7.3.1. Determinación de la composición de Monosacáridos

Hidrólisis ácida: Dada la supuesta naturaleza polisacáridica de los extractos, se abordó la identificación y cuantificación de los monosacáridos liberados tras su hidrólisis ácida. Se pesó alrededor de 1 mg de cada uno de las muestras, hidrolizando con 1 mL de ácido trifluoroacético (TFA) durante 1 h a 120°C. La concentración de ácido varió según los casos: 0,15 M, 3 M ó hidrólisis sucesivas con las anteriores concentraciones de TFA. Inmediatamente después de la hidrólisis se añadió a cada hidrolizado 1 mg de mio-inositol como patrón interno, evaporando a continuación a sequedad en un rotavapor.

Derivatización: Los monosacáridos son sustancias no volátiles, y para poder analizarlos por cromatografía de gases (CG) es necesario derivatizarlos para convertirlos en moléculas volátiles. De entre los posibles derivados, se eligieron dos:

a) los *acetatos de alditol* que producen un único derivado de cada monosacárido dando lugar a cromatogramas más simples, aunque en este caso, no permiten la detección de ácidos urónicos.

b) Las *oximas trimetilsililadas* originan dos picos por cada azúcar reductor (correspondientes a los isómeros *E* y *Z* de la oxima) y, por tanto, dan cromatogramas más complejos, pero como ventaja permiten la identificación simultánea de azúcares, ácidos urónicos y otros compuestos presentes en la muestra.

Obtención de acetatos de alditol. Los monosacáridos liberados en la hidrólisis se redujeron con NaBH_4 en 1 mL de agua a temperatura ambiente durante 12 h. A continuación, se destruyó el exceso de borohidruro por adición de HCl concentrado hasta pH ácido y se evaporó en rotavapor a 70°C. Para eliminar las sales de boro formadas, se lavó 3 veces con 2 mL de metanol. Finalmente, los alditos formados se acetilaron con 500 μL de piridina-anhídrido acético (1:1), durante 1 h en estufa a 100°C y se evaporaron a sequedad a 70°C (Laine *et al.*, 1972).

Análisis por cromatografía de gases (CG). En el momento de analizar las muestras, se disolvieron en 200 μL de cloroformo y se tomó una alícuota de 1 μL , que fue inyectada en el cromatógrafo. El análisis cromatográfico se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases Agilent 7980A, con una columna HP-5MS (30m x 0,25 mm, 0,2 μm espesor de la película), inyector split/splitless, helio (0,6 mL min^{-1}) como gas portador y detector de ionización de llama. Inyector y detector se programaron a una temperatura de 250°C y para la separación de los monosacáridos se empleó un programa de temperaturas que comienza isotérmicamente a 190°C (2 min), aplicando a continuación una rampa de temperatura de 2°C min^{-1} hasta una temperatura final de 225°C. El pico de cada azúcar en el cromatograma se identificó comparando su tiempo de retención con los de patrones analizados en idénticas condiciones. La cuantificación se realizó atendiendo al área de los picos y a los factores de respuesta obtenidos con diferentes monosacáridos patrón.

Obtención de oximas trimetilsililadas. Los hidrolizados, completamente secos, se resuspendieron en 250 μL de una solución de cloruro de hidroxilamina en piridina al 2,5% para formar las oximas de los azúcares a 70°C durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, se añadieron 150 μL del agente sililante, bis-trimetilsilil trifluoroacetamida (BSTFA) para formar los derivados a 80°C durante 10 minutos (Rojas-Escudero *et al.*, 2004).

El análisis de las muestras se realizó por cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-EM) en un instrumento Agilent 7980A-5975C con un programa de temperaturas que comienza a 180°C para subir a razón de 2°C min^{-1} hasta 280°C (1 min). Los picos de cada azúcar en el cromatograma se identificaron tanto por su espectro de masas como por comparación de su tiempo de retención con los de patrones analizados en idénticas condiciones. El análisis cuantitativo de los azúcares se llevó a cabo calculando los factores de respuesta de los monosacáridos con respecto al mio-inositol, compuesto que presenta un solo pico cromatográfico que no interfiere con los carbohidratos presentes en las muestras. Otros componentes no

glucídicos de las muestras detectados mediante este análisis fueron identificados por comparación con la base de datos Wiley 8ª edición con NIST 2005.

7.3.2. Estudio de los tipos de enlace de los polisacáridos mediante análisis de metilación

Para llevar a cabo la investigación de los tipos de enlace existentes en los polisacáridos se empleó la técnica de análisis por metilación. El análisis completo comprende varias etapas. En primer lugar, hay que convertir los grupos –OH libres del polisacárido en grupos O-metilo. Los hidroxilos libres presentes en un polisacárido serían todos aquellos que no lleven sustituyentes estables ni intervengan en enlaces glicosídicos o en el cierre del anillo. A continuación, el polisacárido permetilado se hidroliza con ácido, en nuestro caso con ácido trifluoroacético (TFA) y se convierten los monosacáridos liberados en sus correspondientes acetatos de alditol. En caso de que el polisacárido contuviera ácidos urónicos es preciso reducirlos hasta alcoholes antes de la hidrólisis y de esta manera poder analizarlos también.

Metilación. Existen varios métodos de metilación. En el presente trabajo se utilizó el método de Ciucanu y Kerek (1984) modificado por Needs y Selvendran (1993).

Las muestras (1-3 mg) se disolvieron completamente en 1 mL de DMSO ayudándonos para su mejor disolución de un baño de ultrasonidos. Se añadieron entre 50 y 100 mg de hidróxido sódico pulverizado, sonicando durante 1h. La metilación efectiva depende del grado de ionización de los OHs libres, por ello se hace necesario efectuar la reacción en un medio básico y así provocar que dichos grupos OH se transformen en alcoxilo. A continuación se enfriaron los tubos en un recipiente con hielo picado y se añadió 1 mL de yoduro de metilo previamente enfriado en nevera, sonicando durante 2 h. Los productos de la reacción, recogidos con 2 mL de cloroformo-metanol (1:1), se dializaron frente a agua durante 72 h, posteriormente frente a etanol-agua (1:1) durante 24 h y finalmente, se evaporaron a sequedad en rotavapor.

Reducción de grupos carboxilo de los ácidos urónicos. Puesto que algunas de las muestras contenían ácidos urónicos, los polisacáridos una vez metilados fueron tratados durante 12 h a temperatura ambiente con 2 mg de borohidruro sódico deuterado (NaBD_4), como agente reductor, en 500 μL de etanol:agua (3:1) según el método descrito por Hollingsworth *et al.* (1984). Mediante esta reacción se consigue la reducción del grupo carboxilo a un alcohol, introduciendo además en la posición que se ha reducido, un marcaje de masa de +2 Da (por la incorporación de dos átomos de deuterio), en comparación con la masa de las posiciones no deuteradas. El exceso de borohidruro se destruyó por adición de HCl concentrado, evaporando después a

sequedad y lavando con 2 mL de metanol (3 veces) para eliminar las sales de borato remanentes.

Hidrólisis. Los polisacáridos permetilados y con los posibles grupos carboxilo reducidos (por ello, ahora convertidos en alcoholes y susceptibles de hidrolizarse y derivatizarse) se hidrolizaron para obtener monosacáridos parcialmente metilados, que se derivatizaron para dar lugar a sus correspondientes acetatos de alditol parcialmente metilados. La reducción y acetilación se realizó según el método de Laine *et al.* (1972) con una única modificación, que consiste en reducir con NaBD₄ para introducir un marcaje de masa en el C-1. Los acetatos de alditol parcialmente metilados se analizaron mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM) en un instrumento Agilent 7980A-5975C equipado con una columna HP-5MS (30m x 0,25 mm, 0,2 µm espesor de la película), con helio (15 psi) como gas portador y aplicando un programa de temperatura: 170°C (1 min), rampa de 2°C min⁻¹ hasta 210°C (1 min). El inyector y la línea de transferencia se mantuvieron a 250°C durante el análisis. La relación de *split* durante la inyección fue de 50:1.

Cada uno de los picos del cromatograma se identificó mediante su tiempo de retención y su espectro de masas. La cuantificación se realizó atendiendo al área de los picos.

7.3.3. Espectroscopía de infrarrojo (IR)

La naturaleza de los enlaces glicosídicos entre los monosacáridos que forman un polisacárido, así como la presencia de sustituyentes de tipo acetamida, carboxilo o sulfato puede ser reconocida a partir de bandas de absorción características de su espectro IR por tanto, los espectros de IR dan información acerca de la configuración α o β de los monómeros, así como de la presencia de grupos de tipo N-acetilo, carboxilo, fosfato o sulfato (Barker *et al.*, 1956). Las muestras se analizaron mediante la técnica del KBr, para lo cual se fabricó una pastilla de con 300 mg de KBr y 1-2 mg de muestra finamente pulverizada en un mortero de ágata, prensando posteriormente hasta conseguir la pastilla. Las muestras se analizaron en un instrumento FTIR 4200 tipo A (Jasco Corporation, Tokyo, Japan) en el rango de 400–4000 cm⁻¹. El detector empleado fue del tipo TGS con una resolución de 4 cm⁻¹.

7.3.4. Resonancia magnética nuclear (RMN)

La RMN es una técnica especialmente informativa e interesante para el análisis estructural de polisacáridos. Es una técnica no destructiva y la muestra no precisa un tratamiento especial aparte de la lógica purificación y su disolución en el solvente empleado para el análisis. Sin embargo, comparada con otras técnicas analíticas es, posiblemente, menos sensible ya que la cantidad de material requerido, después de la

purificación, debe estar, al menos, en el rango de multimiligramos. Por otra parte, la adecuada combinación de una serie de experimentos mono- y multidimensionales de RMN (estándar, tanto homonucleares como heteronucleares) permite incrementar su sensibilidad.

Los espectros de RMN aportan información acerca del número e identidad de monosacáridos, o más bien de residuos glucídicos, que constituyen la unidad repetitiva del polímero. Además, permite identificar la estereoquímica (configuración anomérica α o β) de los enlaces glicosídicos y, en determinados casos, se puede llegar a determinar la secuencia de la unidad repetitiva.

La determinación de la estructura primaria de un polímero mediante RMN requiere la correcta asignación de las señales de protón y carbono correspondiente a los átomos de cada uno de los residuos (monosacáridos, sistemas de espín) que constituyen el polisacárido. Las señales (δ =desplazamiento químico, unidades ppm) de RMN características de los azúcares se agrupan en un estrecho intervalo de frecuencias, de modo que el inevitable solapamiento de señales dificulta considerablemente la asignación individual de las mismas. Afortunadamente, las señales de los protones/carbonos anoméricos de cualquier monosacárido son fácilmente reconocible ya que aparecen separadas del resto de señales y a campos más bajos (^1H RMN $\sim 4.0\text{-}5.5$ ppm o ^{13}C RMN $\sim 95\text{-}105$ ppm). La zona anomérica es también muy útil para deducir de forma aproximada el número y naturaleza de los residuos (monosacáridos diferentes, o iguales, pero con diferentes entornos) que constituyen el fragmento principal del polímero.

Aparte del desplazamiento químico (frecuencia de resonancia) característico de cada núcleo presente en la molécula, las señales de resonancia suelen estar desdobladas (multipletes) debido a la interacción de cada núcleo con los núcleos vecinos lo que proporciona información acerca del entorno químico de cada átomo. En caso de que la resolución espectral lo permita, se puede deducir la relación espacial entre los núcleos a partir de la medida de la distancia entre los picos de cada multiplete (J , constante de acoplamiento escalar, unidades: Hz). Este parámetro da cuenta de cómo cada núcleo, que se comporta a su vez como un pequeño campo electromagnético, afecta a su entorno (acoplamiento de espín).

Una vez se han identificado las señales anoméricas, se procede a determinar la configuración anomérica de los azúcares (α/β) mediante espectros de protón de alta resolución que permitan medir los valores de $J_{\text{H1,H2}}$ que son característicos de las configuraciones α y β de los azúcares ($J_{\text{H1,H2}} \sim 4$ Hz y $J_{\text{H1,H2}} \sim 8$ Hz respectivamente para sistemas tipo glucosa/galactosa).

Tras identificar los protones/carbonos anoméricos, si las características de la muestra así lo permiten, se asignan el resto de las señales de los protones/carbonos de los anillos del polisacárido mediante experimentos adicionales que diseccionan, virtualmente, el polímero en unidades individuales (residuos/monosacáridos) más sencillas de identificar. En general para la asignación de las señales de ^1H se utilizan experimentos basados en el reconocimiento de patrones de constantes de acoplamiento características de cada tipo de azúcar (^1H , ^1H COSY, ^1H , ^1H TOCSY) y se toma como punto de partida la señal del protón anomérico (H1).

La asignación de átomos de carbono se puede llevar a cabo empleando experimentos de tipo heteronuclear (^1H , ^{13}C , HSQC) que correlacionan los desplazamientos de protón con las señales de carbono a las que están directamente unidos. Los valores de los desplazamientos químicos de carbono se ven afectados por la proximidad de enlaces glicosídicos (comparados con los de azúcares no sustituidos) por lo que pueden utilizarse para determinar el patrón de sustitución de cada residuo de acuerdo con el análisis de metilación. En la tabla 1, se detallan los principales tipos de experimentos de RMN bidimensional y una breve descripción de la información que aportan.

Adquisición de espectros mono y bidimensionales. Los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C fueron adquiridos en un espectrómetro Bruker Avance DRX 500MHz a 298K equipado con una sonda TXI y con unidad de gradientes. Los desplazamientos químicos se referenciaron a la señal HDO a 4.66 ppm. Las muestras liofilizadas se disolvieron en D_2O (500 μL). Los experimentos bidimensionales (TOCSY y HSQC) se adquirieron y procesaron utilizando el software de Bruker (TOPSPIN 2.0).

Experimento	Abreviatura	Descripción
Homonuclear	COSY (COrelation SpectroscopY)	Relaciona protones vecinales del anillo
	TOCSY (Total COrelation SpectroscopY)	Relaciona todos los protones del mismo sistema de espín (anillo/azúcar)
	NOESY (Nuclear Overhauser SpectroscopY)	Relaciona núcleos que se encuentran próximos en el espacio pertenezcan o no al mismo anillo

Heteronuclear	HSQC	(Heteronuclear Coherence)	Single	Quantum	Relaciona un protón y el núcleo de carbono al que esta enlazado
	HMBC	(Heteronuclear Correlation)	Multiple	Bond	Relaciona un protón y un núcleo de carbono separados entre si por cuatro-cinco enlaces (pertenezcan o no al mismo anillo)

Tabla 3. Resumen de abreviaturas de experimentos de 2D RMN y la información estructural extraída de dichos experimentos.

Se resaltan en **negrita** las dos técnicas 2D empleadas en el presente trabajo.

8. VALORACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIVIRAL

8.1. CONDICIONES DE MANIPULACIÓN

La manipulación de líneas celulares y de las preparaciones virales se realizó en un laboratorio de seguridad biológica de nivel P 2-3, de acceso restringido a personal autorizado, en cabinas de seguridad, previamente esterilizadas por radiación ultravioleta, con flujo de aire vertical.

Todo el material utilizado, pipetas Pasteur, pipetas graduadas, puntas, botellas y tubos, fueron previamente esterilizados en autoclave o adquiridos en condiciones de esterilidad

El material de plástico utilizado fue esterilizado y desechado antes de su eliminación definitiva.

8.2. LÍNEAS CELULARES PARA POLIO, HERPES, VSV

Se han utilizado dos tipos de líneas celulares:

- ❖ Células HeLa: Se utilizan en el ensayo de actividad antiviral y para el crecimiento de virus.
- ❖ Células Vero: Se utilizan para la titulación del virus.

Las líneas celulares se cultivaron en medio esencial de Eagle (MEM) modificado por Dulbecco (DMEM). Los medios utilizados han sido esterilizados por filtración a través de membranas de 0'22mm de tamaño de poro, gaseándose posteriormente con CO₂ hasta alcanzar un pH de 7'5. Posteriormente se almacenaron a 4°C hasta su utilización. En el momento de su uso, los medios se suplementaron con:

- Glutamina: a una concentración de 200mM.(-20°C).

- Aminoácidos no esenciales.
- Antibióticos: Estreptomicina y Ampicilina
- Gentamicina
- Suero de ternera (ST): Preparamos DMEM con dos concentraciones de ST
 - DMEM+ST 10% (DMEM-10%); para el mantenimiento y crecimiento de las células.
 - DMEM+ST 2% (DMEM-2%); para realizar la infección con el virus.

En todos los experimentos en que se realizó un marcaje con metionina radiactiva se utiliza DMEM sin metionina suplementado con glutamina, antibióticos antimicóticos y gentamicina.

Subcultivos celulares: Se hizo necesario cambiar el medio de las células, y trasladarlas a otras placas para que no mueran por falta de espacio físico o falta de nutrientes (capa monoconfluente). Este procedimiento también se utilizó para sembrar placas al realizar otros experimentos.

Material

- Pipetas Pasteur
- Placas P100
- Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).
- Tripsina.

Método

El procedimiento consistió en lavar las células con EDTA, para debilitar las uniones proteicas de las células con la placa y levantarlas posteriormente con tripsina, la cual, destruye totalmente las uniones proteicas y despega las células.

8.2.1. Conservación de líneas celulares

Material

- | | |
|----------------------------|-----------------------------|
| • Criotubos | • Pipetas Pasteur. |
| • Dimetilsulfóxido (DMSO). | • Medio DMEM con ST al 20%. |

Método

La conservación de las líneas celulares, se llevó a cabo en tanques de nitrógeno líquido en presencia de un agente crioprotector, como el DMSO al 7% en medio DMEM con una concentración elevada de suero, 20%. El DMSO disminuyó el choque osmótico causante del daño celular durante el proceso de congelación. Este compuesto tiene la propiedad de difundir con gran rapidez dentro y fuera de las células. Las células congeladas se mantuvieron en criotubos.

8.2.2. Descongelación de líneas celulares

Material

- Pipetas Pasteur.
- Placas P100 o P60.
- Medio DMEM ST 10%.

Método

El proceso de descongelación se realizó lentamente para dañar lo menos posible las células. Éstas se diluyeron en un volumen de medio con suero, lentamente para evitar cambios bruscos de las condiciones osmóticas. Tras centrifugar a 2000 rpm durante 5 minutos se sembraron en una placa favorecer su crecimiento.

8.3. PREPARACIONES VIRALES

Los virus no VIH utilizados en el presente trabajo han sido:

- ♦ Virus del Herpes simple tipo 1 (VHS-1) (virus ADN).
- ♦ Virus de la Polio (virus ARN).
- ♦ Virus de la Estomatitis Vesicular (VSV) (virus ARN).

8.3.1 Conservación de las preparaciones virales

Las preparaciones virales se conservaron en alícuotas de distintos volúmenes en un congelador (Sanyo ultra Low) a -70°C.

El stock de virus se mantuvo en criotubos introducidos en tanques de nitrógeno.

8.3.2 Crecimiento de virus

Material

- | | |
|----------------------------|------------------------------|
| • Placas 100. | • Acetona. |
| • DMEM-2% ST. | • Tubos de ensayo con tapón. |
| • Tripsina. | • Células HeLa |
| • EDTA. | • Centrifuga. |
| • Hielo y nieve carbónica. | |

Método

Para el crecimiento del virus se utilizan células HeLa crecidas en placas p96. Éstas fueron infectadas a baja multiplicidad de infección, 0,1 unidades formadoras de placa (ufp), en medio DMEM-2% ST. Tras incubar a 37°C durante una hora y media, periodo de adsorción del virus, se eliminó el medio y se añadió medio fresco. Pasado un periodo de 24 horas, para el virus de la polio y VSV y de 48 horas para el VHS-1, se procedió a recoger las células, tras haber comprobado microscópicamente que las células estaban infectadas y presentaban el efecto citopático (ECP). El volumen total se recogió en varios tubos que se sometieron a una centrifugación en un rotor Sorvall SS-34 a 4000 rpm durante 10 minutos a una temperatura de 4°C; éste proceso se realizó para sedimentar los restos celulares. El sobrenadante, que contiene el virus extracelular, se recogió en una botella que se mantuvo inmersa en hielo a una temperatura de 4°C. El pellet se resuspendió en la décima parte del volumen inicial de

cada tubo utilizando agua destilada. A continuación se procedió a congelar-descongelar tres veces de forma muy rápida en nieve carbónica y acetona; éste proceso de congelación-descongelación provocó la rotura de las células y la salida del virus intracelular que pueda quedar en ellas. Las células rotas se sometieron a una nueva centrifugación en el mismo rotor a 2500 rpm durante 20 minutos a una temperatura de 4°C. El sobrenadante se recogió en la misma botella que el virus extracelular.

8.3.3 Valoración del título del virus

Material

- Placas P60
- Solución PBS-ST 0'5%
- Agar
- Medio DMEM doblemente concentrado (DMEM-2 X)
- Formaldehído
- Células Vero

Método

La valoración del título del virus se realizó en unidades formadoras de placa (ufp), según el método estándar de la placa de lisis.

Para ello se sembraron placas P60 con células Vero hasta confluencia.

Posteriormente las monocapas confluentes se infectaron con 400 µl de diluciones 10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8} en PBS-ST 0'5% de agar-DMEM, suplementado con glutamina. Tras un periodo 48-72 horas se fijaron las células con formaldehído al 10%, retirándose posteriormente la capa de agar solidificado. Por último, se tiñó la monocapa con cristal violeta al 2% y formaldehído al 10%; tras varios lavados con agua se detectaron las placas de lisis, lugar donde cayeron una o varias partículas víricas que gracias al agar solidificado no pudieron extenderse libremente por la monocapa celular. A continuación, contamos el número de placas para estimar las ufp por unidad de volumen.

8.4. ENSAYO DE ACTIVIDAD ANTIVIRAL

Material

- Limbros de 24 pocillos
- Medio DMEM-10% ST
- Medio DMEM-2% ST

Método

Los extractos y fracciones en estudio se ensayaron en un rango de concentraciones comprendido entre 0 y 500 µg/mL.

La actividad antiviral se determinó mediante un test de protección de ECP.

Para ello, se crecieron células HeLa en placas de 24 pocillos (L_{24}) en medio DMEM-10% ST. Cuando los pocillos llegaron a confluencia se eliminó el medio y se añadieron las distintas concentraciones del compuesto en estudio en 100 µL de DMEM-2% ST,

dejando el primer pocillo como pocillo control. A continuación se infectaron las células a una multiplicidad de infección de 1 upf/célula para el VHS, y 0,5 upf/célula para el VSV y el Poliovirus, en 100 μ L de DMEM-2% ST y se dejaron incubando a 37°C, durante 24-48 horas, según el virus del cual se trate. Cuando toda la monocapa del pocillo control, sin compuesto, estuvo infectada se observó el ECP producido por el virus y la protección por el compuesto en estudio en los restantes pocillos. El ECP se valoró inicialmente mediante observación al microscopio tomándose como referencia el pocillo control, el cual no contiene el compuesto que se analiza, al que se le da el valor de 100% de ECP ó máximo ECP. Los demás pocillos se valoraron de acuerdo con la siguiente escala: 75% de células con ECP, 50% de células con ECP, 25% de las células con ECP, y 0% o no se observa ECP. Esto nos da una idea aproximada de la actividad del compuesto, pero no definitiva ya que es difícil valorar visualmente el % de recuperación de las células infectadas (de ahí que este dato no aparezca reflejado en las gráficas).

Posteriormente, se confirmaron estos datos midiendo la síntesis de proteínas durante una hora en las células que hayan sobrevivido a la infección, o que se hayan recuperado por la acción de nuestro compuesto en estudio, dato que nos va a indicar el % de viabilidad celular.

En todos los ensayos de actividad antiviral se utilizaron distintos compuestos con actividad antiviral conocida frente a cada uno de los virus escogidos, como controles positivos.

8.5. ENSAYO DE CITOTOXICIDAD

Material

- Placas de 24 pocillos
- Medio DMEM-2%
- Medio DMEM-10%

Método

El ensayo de citotoxicidad se realizó simultáneamente en placas de 24 pocillos en los que realizamos el ensayo de actividad antiviral.

El método que se emplea para el ensayo de citotoxicidad es el mismo que en el ensayo actividad antiviral, salvo que en este caso no inoculamos el virus, sino que únicamente se añade el compuesto en 200 μ L de DMEM-2% ST, siguiendo la misma metodología a partir de este paso.

Observamos al microscopio los pocillos en los que no hemos inoculado el virus. Se toma como referencia de 100% de % de viabilidad celular el pocillo control, sin compuesto y sin virus. Valoramos cualitativamente el resto de los pocillos, según la siguiente escala:

- ❖ No citotóxico: 100% de viabilidad celular.
- ❖ Ligeramente citotóxico: 75% de viabilidad celular.
- ❖ Citotóxico: 50% de viabilidad celular.
- ❖ Muy citotóxico: 0% de viabilidad celular.

Esta observación microscópica inicial nos permitió intuir la presencia o ausencia de citotoxicidad del compuesto. La cuantificación de esta observación microscópica inicial se realizó mediante la medida de síntesis de proteínas en 1 hora, lo que nos dio un dato más fiable del % de viabilidad celular.

8.6 MEDIDA DE RADIATIVIDAD EN PRODUCTOS BIOLÓGICOS

Material

- ◆ Metionina-³⁵S.
- ◆ Medio DMEM sin metionina.
- ◆ Ácido tricloroacético (TCA).
- ◆ Etanol.
- ◆ Solución de NaOH y dodecilsulfato sódico al 1% (SDS).
- ◆ Líquido de centelleo.
- ◆ Contador de radiación β LKB Wallac 1219 RackBeta.

Método

Para cuantificar el efecto protector del compuesto en estudio frente a la infección por virus, así como su toxicidad, medimos la síntesis de proteínas en una hora, marcando con metionina-³⁵S.

Para ello eliminamos el medio existente en los pocillos, para continuar lavando dos veces con medio DMEM sin metionina. A continuación se añadieron unos 200 μ L de la solución de ³⁵S-Met en DMEM sin metionina en cada pocillo, dejando en incubación durante una hora a 37°C.

Posteriormente eliminamos el medio y añadimos TCA al 5%; el TCA va a precipitar las macromoléculas, dejándolo actuar durante 5 min. Hecho esto procedimos a eliminar el TCA, y lavamos dos veces con etanol para eliminar los restos de aminoácidos marcados y ayudar a secar los pocillos. Finalizamos añadiendo 200 μ L de una solución de NaOH y SDS al 1% en cada pocillo, pasando el contenido del pocillo a un tubo de centelleo. Añadimos 2 mL de líquido de centelleo a cada tubo midiendo en un contador de radiación β .

8.7. LÍNEAS CELULARES Y MEDIOS DE CULTIVO EN VIH

8.7.1. Medios de cultivo.

Los medios de cultivo que se utilizaron fueron RPMI 1640 y DMEM (Biowhitaker, Walkersville, MD). Todos los medios de cultivo fueron suplementados con 10% de suero bovino fetal (STF, Biowhitaker) y 20 mM de L-glutamina y antibióticos: penicilina (100U/ml) y 100 µg/mL de estreptomina (Biowhitaker,) Todos los cultivos tanto de células primarias como de líneas celulares se incubaron a 37°C en una atmósfera saturada de humedad y controlada con CO₂ al 5% en aire.

8.7.2. Cultivos celulares primarios y líneas celulares

- ❖ MT-2 (Harada et al,1985) es una línea celular linfoblastoide, derivada de linfocitos CD4 transformados con el virus de la leucemia humana de células T tipo I (HTLV-I) obtenidas de American Type Culture Collection (ATTCC, Rockville, MD). Esta línea celular se cultivó a una densidad de $3 \cdot 10^5$ /ml en medio RPMI1640 suplementado con 10% de BCS, 2mM de glutamina y antibióticos: penicilina (100U/mL) y estreptomina (100 µg/mL).
- ❖ PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) o células mononucleares de sangre periférica). Se obtuvieron de “buffy coats” de donantes sanos mediante procedimientos estándar. Brevemente, se añaden 10 mL de ficoll en tubos de 50 mL agregando 25 ml de sangre del “buffy coat” muy suavemente por las paredes del tubo. Centrifugamos 30 min. a 2000 rpm sin freno a 18-20°C. Recogemos la zona del anillo con una pipeta muy suavemente y lisamos los eritrocitos durante no más de 10 minutos. Posteriormente, lavamos dos veces con PBS 1x, centrifugando 10 min a 1200 rpm a 18-20°C. Contamos las células y realizamos los lavados necesarios hasta eliminar las plaquetas. Se cultivan en el mismo medio que las MT-2.
- ❖ RAJI es una línea celular de linfoblastos B, donada por el Dr. Toraño del Centro Nacional de Microbiología del ISCIII. RAJI DC-SIGN es una línea celular obtenida a partir de células RAJI que expresan establemente el receptor DC-SIGN y fue donada por el Dr. Arenzana-Seisdedos del Instituto Pasteur. Estas dos líneas celulares se cultivan en medio RPMI completo. El medio de cultivo se renueva cada dos días, y se crecen a una densidad de $5 \cdot 10^5$ /mL.

- ❖ 293T es una línea celular embrionaria de riñón que expresan el antígeno T de SV-40. Las células 293T se cultivaron en medio DMEM suplementado con 10% de BCS y 2mM de glutamina y antibióticos: penicilina (100U/mL) y estreptomycin (100 µg/mL).

8.8 STOCKS VIRALES Y PLÁSMIDOS EN VIH.

- ❖ El plásmido **pNL4-3** (Adachi et al., 1986) es un clon recombinante de las cepas NY5 (5') y LAV (3') que contiene el genoma completo del VIH-1 y genera una progenie infecciosa tras su infección en numerosas líneas celulares y también en linfocitos CD4+.
- ❖ El vector **pNL4-3Ren** (García et al., 2007) se generó sustituyendo el gen *nef* del plásmido pNL4-3 por el gen de la luciferasa Renilla en las posiciones Not I (8797, introducida por mutagénesis dirigida) y Xho I (8887).
- ❖ Los **sobrenadantes** infecciosos se obtuvieron a partir de la transfección de células 293T con el plásmido pNL4-3Ren mediante el método del fosfato cálcico. El sobrenadante que contiene el virus se recoge dos días después, y se preserva a -80°C hasta su utilización en los ensayos de evaluación de la actividad antiviral de los compuestos.

8.9. ENSAYOS DE ACTIVIDAD ANTIVIRAL EN VIH

La evaluación de la actividad anti-HIV de los diferentes extractos se realizó mediante tres métodos:

Todos los parámetros fueron calculados con el programa de estadística Graph-Pad®.

8.9.1. Inhibición de la Infección en *Trans* mediada por células Raji DC-SIGN.

Los experimentos se realizan por triplicado. Los controles usados en el experimento son: control sin virus (control negativo); células RAJI (5×10^5 por criotubo en 100 µL de medio RPMI, control negativo o background) que no expresan el receptor DC-SIGN; manano (control positivo) que bloquea la unión de DC-SIGN al virus; PBS (control negativo). Las preincubaciones e infecciones se realizaron en agitación a temperatura ambiente. Las células Raji DC-SIGN (5×10^5 por criotubo en 90 µL de medio RPMI) se preincubaron durante 1 hora con los compuestos en estudio (concentración final de 100, 10 o 1 µg/mL), manano (concentración final de 100 µg/mL) o PBS 1x. Después, el preincubado se infecta con una concentración de virus de 150 ng de proteína gag-p24 (100.000 RLUs/pocillo) de los virus JR Renilla (tropismo R5) o NL4.3 Renilla (tropismo X4) durante 2 horas. Posteriormente, los criotubos se lavan con PBS (4 x 1mL), las células se resuspenden en 500 µL de medio RPMI fresco y se transfieren a una placa de 96 pocillos de fondo redondo (100 µl por pocillo) y se co-cultivan con los PBLs

autólogos (2.5×10^5 por pocillo en 100 μ L de medio RPMI) a 37°C. Para evaluar el bloqueo de la transferencia de virus mediada por las células RAJI DC-SIGN, las células se lisan después de 48 horas y se mide la actividad luciferasa con el kit Renilla Luciferase Assay (Promega) utilizando un luminómetro para microplatos de 96 pocillos (Orion, Berthold, Oak Ridge, TN).

8.9.2. Ensayo de Neutralización

La neutralización se realiza preincubando a 37°C durante una hora los sobrenadantes infecciosos de NL4.3 Renilla con las concentraciones activas de los compuestos y los controles. Después de una hora de incubación se utiliza una dilución de este sobrenadante (100.000 RLUs/pocillo) para infectar células MT-2 durante 48 horas. Los experimentos se realizan por triplicado en microplatos de 96 pocillos de fondo redondo y se utiliza PBS o RPMI como controles negativos. En resumen, se preincuban los compuestos a ensayar (20 μ L de una disolución madre de 200 μ g/mL) y el virus NL 4.3-Ren (20 μ L o 120 ng p24). Posteriormente, con 10 μ L de esta incubación, es decir 30 ng, se infecta un pocillo con células (en 190 μ L) durante una hora a 37°C. Después, 10 μ L de este sobrenadante neutralizado se utiliza para infectar células MT-2 (1×10^5 por pocillo en un volumen de 190 μ L), diluyéndose la concentración de los compuestos 20 veces hasta una concentración final de 5 μ g/mL. *Controles:* Se infectan células MT-2 (1×10^5) con el mismo sobrenadante viral sin neutralizar. A las 48 horas se evalúa la replicación del virus midiendo la actividad luciferasa de los lisados celulares con el kit de Renilla Luciferase Assay (Promega) utilizando un luminómetro para microplatos de 96 pocillos (Orion, Berthold, Oak Ridge, TN).

8.9.3. Ensayo de viabilidad celular en células RAJI DC-SIGN y en Neutralización

Para el ensayo de viabilidad celular se empleó el kit CellTiter-Glo® Luminiscent cell viability assay (Promega) que mide la actividad mitocondrial. El ensayo de viabilidad se realiza mediante un protocolo exactamente igual al utilizado para la evaluación de la infección mediada por DC-SIGN. Para la neutralización, los compuestos son evaluados a las concentraciones presentes en el proceso de neutralización para evaluar un potencial efecto tóxico a nivel celular. A las 48 horas se mide la actividad luciferasa siguiendo las instrucciones del fabricante del kit CellTiter-Glo®, que cuantifica la cantidad de ATP (que esta directamente relacionada con la presencia de células metabólicamente activas) midiendo la actividad luciferasa del lisado en un luminómetro para microplatos de 96 pocillos (Orion, Berthold, Oak Ridge, TN).

9. VALORACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA

9.1. CONDICIONES DE MANIPULACIÓN

Para determinar la inhibición en la liberación de mediadores de la inflamación y la citotoxicidad producida por las muestras se utilizaron macrófagos intraperitoneales de ratón que hubo que extraer y cultivar previamente.

9.1.1 Extracción de macrófagos

Material

- Ratones macho, de cepa ICR de 8 a 12 semanas de edad, de 25g de peso, en estabulario, en grupos de 10-15 animales por jaula con comida y agua.
- Cámara de Neubauer, contador celular.
- Micropipetas y puntas correspondientes y tubos Falcon
- Cámara de flujo laminar
- Incubadora a 37°C y 5% de CO₂
- Placas de 96 o 24 pocillos
- Medio RPMI 1640 (Gibco®) suplementado con FBS (Gibco®) al 10%.
- PBS (Cl₂Ca y Cl₂Mg)

Método

Se inyectó intraperitonealmente a los ratones tioglicolato, sustancia que promueve la proliferación de macrófagos. Tres días después, se procedió a la extracción de los macrófagos, tiempo en el cual se ha producido la proliferación mas optima de los mismos. Para llevar a cabo la extracción, se anestesió a los animales en una cuba con un algodón embebido en éter etílico.

Seguidamente, se procedió al guillotinado de los animales (muerte y desangrado). El objetivo de desangrar al individuo lo máximo posible, es para evitar que la contaminación con glóbulos rojos pueda interferir en el conteo de macrófagos. A continuación, se colocó al ratón en postura de cubito supino, se abrió un ojal en la piel del abdomen y se inyectaron 5mL de PBS, para posteriormente realizar un ligero masaje de la cavidad peritoneal. Ayudándonos de una pinzas, hicimos un pellizco en la piel con cuidado de no pinzar también el peritoneo y haciendo un pequeño corte, tiramos de la piel dejando el peritoneo al descubierto, para finalmente, cortar el trozo de piel ya levantada.

Posteriormente, realizamos una incisión en el peritoneo y con una pipeta Pasteur esterilizada recogimos el líquido intraperitoneal que se mantuvo a 4°C (en hielo picado).

Se midió la cantidad de líquido extraído, y se realizó un recuento celular en la cámara de Neubauer para determinar un promedio en el número de macrófagos por mL extraídos.

Se centrifugó la solución buffer extraída del peritoneo a 1000rpm durante 10min a 4°C para provocar la precipitación de los macrófagos y se procedió al cultivo de los mismos.

9.1.2. Cultivo de macrófagos

Se eliminó por decantación el sobrenadante obtenido tras la centrifugación del PBS que contenía los macrófagos y se resuspendieron las células en el medio de cultivo DMEM previamente suplementado con antibiótico y suero fetal bovino al 10%, obteniendo una concentración de un millón de células por mL. A continuación, se distribuyó el medio de cultivo que contiene los macrófagos en placas de 96 o 24 pocillos a la concentración especificada para cada ensayo y se incubaron a 37°C, una atmósfera de 5% de CO₂, durante 24h.

9.2. ENSAYO DE CITOTOXICIDAD

La citotoxicidad de los compuestos que tenemos que ensayar lo determinamos mediante el parámetro de respiración celular, para ello utilizamos el método de microcultivo MTT o ensayo de viabilidad celular MTT, modificado por Mosmann (1983). Éste método se basa en la ruptura de la sal de tetrazolium (Bromuro de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium (MTT)) soluble dando lugar a un producto coloreado azul llamado formazan que es insoluble, y es medido espectrofotométricamente, este proceso es mediado por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa que forma parte de la cadena respiratoria. Ésta conversión sólo se realiza en células metabólicamente activas, generando equivalentes reducidos como NADH y NADPH, la actividad enzimática y la cantidad de formazan producido es proporcional al número de células presentes en la muestra. La reducción en la cantidad de células por un agente citotóxico, puede ser generalmente explicado por la muerte y/o inhibición de la proliferación de células.

Se utiliza para determinar proliferación celular, medir la respuesta a los factores de crecimiento y citokinas, así como para la cuantificación de efectos antiproliferativos y citotóxico mediados por el factor de necrosis tumoral. En estudios de cáncer se utiliza para la cuantificación “in vitro” de células tumorales aplicados al screening de compuestos anticancerígenos y terapia de fotorradiación. Para obtener resultados eficientes se recomienda trabajar con 100.000cels por pocillo y las absorbancias se deben encontrar en el rango de 0,75 a 1,25 y los ensayos deben realizarse por triplicado.

Material

- PBS
- Medio RPMI 1640 (Gibco®) suplementado con FBS (Gibco®) al 10%.
- Antibiótico Estreptomicina-penicilina
- Suero fetal bovino (FBS)
- Placa de 96 pocillos
- MTT (Sigma®)
- DMSO (Sigma®) o agua destilada
- Lector de placas DIGISCAN® Micro Reader 340.

Método

Se sacaron las placas de 96 pocillos de la estufa donde habían permanecido los macrófagos durante 24h en cultivo* y se añadieron distintas concentraciones de la muestra a probar, se cultivaron las células junto con las muestras problema a las concentraciones escogidas que son 6,25, 12,5, 25, 50, 100 y 200µg/mL., dejando uno de los pocillos como control positivo (solo células) y otro como control negativo (solo medio), se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ durante 4 horas. Tras este periodo, se añadió MTT (concentración final de 0,5 mg/mL), incubando a 37°C y 5% CO₂ durante 4 horas más. A continuación, se retiró el medio y se añadieron 100µg de DMSO, para solubilizar las sales de formazan (insolubles en solución acuosa) y 10min en oscuridad. Tras agitar unos minutos se procedió a su lectura a 540nm en un espectrofotómetro DIGISCAN® Micro Reader 340.

*Ver cultivo de macrófagos

Existe una relación lineal entre la actividad celular y la absorbancia.

Se calculó el porcentaje de inhibición de acuerdo a la relación de absorbancias entre el control y las muestras.

9.3 ENSAYO DE ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA

En nuestro caso hemos utilizado modelos de actividad antiinflamatoria “*in vitro*”, centrándonos en la cuantificación de mediadores de la inflamación.

Una vez que hemos obtenido los cultivos de macrófagos los vamos a estimular con la producción de determinados mediadores de la inflamación y comprobar si los extractos a probar son capaces o no de inhibir la liberación de eicosanoides por las células.

De entre la multitud de mediadores hemos escogido para el estudio por su relevancia fisiológica,

- Óxido nítrico (NO)
- Factor de necrosis tumoral α (TNF- α)

Material

- SBF
- Micropipetas de 1000µl y de

Método

Los extractos y las fracciones se ensayan en un rango de concentraciones no tóxica, es decir que en el ensayo de citotoxicidad anteriormente realizado resultan no tóxicas.

Una vez que ya hemos cultivado los macrófagos en las placas de 24 pocillos, y los pocillos ya han llegado a confluencia, los sacamos de la estufa y en campana eliminamos el medio y añadimos las distintas concentraciones del compuesto en estudio en 500 μ l de medio RPMI junto con LPS, a una concentración de 0,25 μ g/pocillo dejando cuatro pocillos como controles, un control positivo donde no hay muestra problema pero si macrófagos con LPS y un control negativo donde se encuentran los macrófagos sin LPS. Además también tenemos que poner sustancias de referencia o patrones a distintas concentraciones, en nuestro caso Aminoguanidina y Dexametasona para el ensayo de NO y TNF α respectivamente. Se dejó incubando a 37°C durante 18 horas. Tras éste periodo de incubación se procedió a recoger el sobrenadante de los pocillos y se centrifugo a 3000rpm durante 10' para precipitar los posibles restos celulares del sobrenadante. Éstos se conservaron a -80°C hasta el momento de su uso para la determinación de TNF α , NO.

9.3.1. Test de NO

Material.

- NaNO₂, 5000 μ M.
- Reactivo de Gries al 50% (Gries 1=Sulfonilamida 2% en H₃PO₄ 10% + Gries 2 = N-(1-Naftil)-etilendiamida 0,2% en agua.
- Espectrofotómetro DIGISCAN® Micro Reader 340.
- Micropipetas multicanal.

Método

Se preparó una curva estándar de Na NO₂ a partir de una disolución 5000 μ M, a las concentraciones de 200, 100, 50, 25, 10, y 5 μ M.

En una placa de 96 pocillos añadimos 100 μ l de cada uno de los sobrenadantes, a continuación añadimos 100 μ l de reactivo de Gries previamente preparado, ya que se trata de dos disoluciones al 50%. Se dejó 10min en oscuridad. Tras agitar unos minutos se procedió a su lectura a 540 nm, en un espectrofotómetro

9.3.2. Test de TNF α

Material

- Anticuerpo de captura (250X), 0,5mL.
- Ac de detección (250X), 0,5mL.
- Standard: solución de TNF α standard para curva de caibración (conservado en nevera a -80°).

- Elisa coating buffer powder: Polvo para recubrir/tapizar pocillos. Se debe reconstituir con 1L de agua desionizada y filtrar (0,22 μ M).
- Diluyente para ensayo: (5X concentrado), 150 μ M.
- Enzima de detección pretrited avidin-HRP.
- Solución sustrato: TMB (100mL) tetrametilbencidine.
- Tampón de lavado: PBS (1X)+Tween 20 (0,05%).
- Solución stop: 1M H₃PO₄ o 2N H₂SO₄.
- Placas de 96 pocillos.
- Papel aluminio y parafilm.
- Espectrofotómetro DIGISCAN® Micro Reader 340.
- Pipetas multicanal.

Método

Se prepara la solución tampón de recubrimiento y se añade a la placa de 96 pocillos 100 μ L + el anticuerpo de tapizado, cubrimos con parafilm y se deja toda la noche en nevera a 4°C.

Aspiramos y lavamos 5 veces con PBS previamente preparado. Para cubrir los huecos que no han quedado tapizados añadimos un diluyente que previamente hay que diluir pues esta concentrado 5X. Y 1h a temperatura ambiente.

Hacemos la curva patrón el rango standard de la curva es de 1000-8pg/mL. Partimos de 1000pg/mL y vamos haciendo diluciones seriadas.

Añadir 100 μ L de la muestra, cubrimos y precintamos la placa e incubamos toda la noche a 4°C.

De nuevo aspiramos y lavamos 5 veces con tampón preparado previamente. Añadimos 100 μ L de Ac de detección previamente preparado. Y una hora cubierto con papel aluminio a temperatura ambiente.

Aspiramos de nuevo y lavamos con buffer 5 veces.

Añadimos 100 μ L del enzima Avidin-HRP, que preparamos previamente, cubrimos con papel aluminio y 30min en oscuridad a temperatura ambiente.

Aspiramos y lavamos 7 veces, manteniendo el buffer en cada lavado unos 2 min.

Añadimos el sustrato 100 μ L y vemos como al añadirlo, la placa se va coloreando de un color mas o menos azul y dejamos unos 15min. Ahora añadimos 50 μ L de solución stop, que hay que preparar previamente.

El color que aparece es el generado por el sustrato unido al enzima y que es proporcional a la cantidad de TNF α . Leemos a 450nm.

RESULTADOS

Material Vegetal

1. Identificación micrográfica de las especies

Al tratarse de una droga pulverizada, se procedió a realizar ensayos botánicos microscópicos y no ensayos de identificación histológicos.

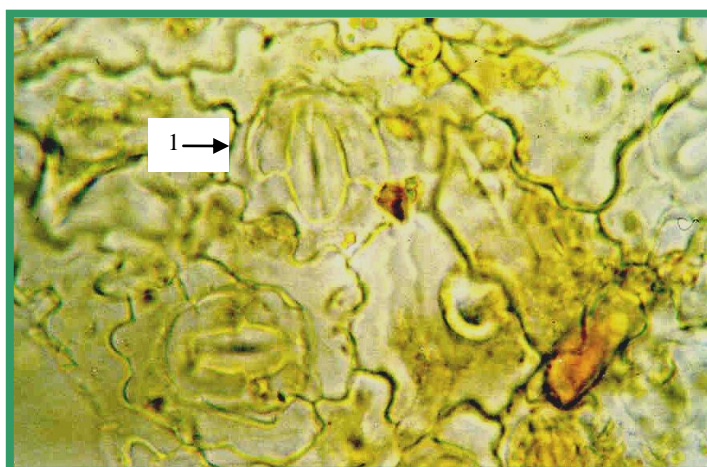
1.1 *Satureja boliviana*

En el examen micrográfico realizado sobre la sumidad florida de *Satureja boliviana* se observan:

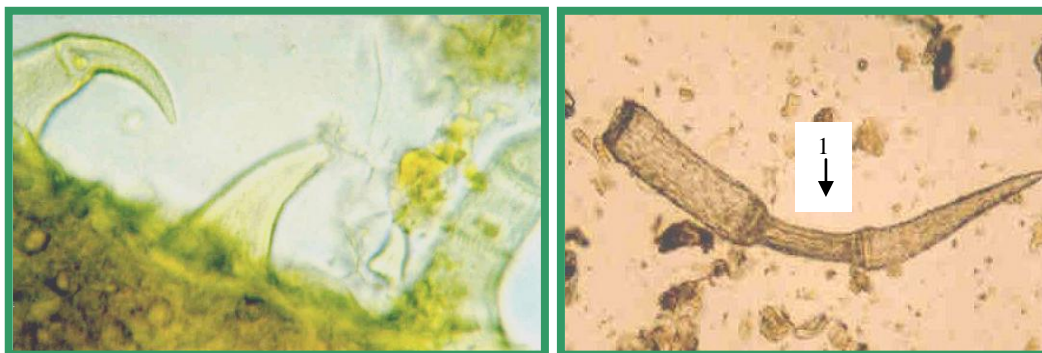
Elementos celulares:

Como elementos celulares de tipo celulósico hemos observado:

- epidermis con las paredes celulares finas, de contorno sinuoso, además se aprecian los estomas (1), con las células anejas que delimitan el ostiolo de forma reniforme propia de las dicotiledóneas y diacíticos pues estas células accesorias presentan su pared común perpendicular al eje central de la apertura estomática. Son característicos en hojas de labiadas.



- abundantes pelos o tricomas, lisos, típicos en drogas que corresponden a la parte aérea de la planta, son pelos tanto tectores como glandulosos, los tectores son unicelulares con forma acicular y pluricelulares, formados por dos, tres y cuatro células en filas, no ramificados. La pared es rugosa en los más viejos y en algunos se observa la penúltima célula algo reabsorbida (1). Los pelos glandulosos son de pie unicelular y las glándulas de esencia son pluricelulares, formadas por unas ocho células. El contenido es amarillento, correspondiente con el aceite esencial son características en las hojas de labiadas.

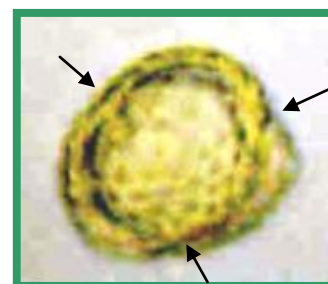


En cuanto a elementos celulares lignificados, para lo cual teñimos con floroglucina clorhídrica observamos vasos estrechos (protoxilema) y enteros pertenecientes a hojas y tallos, espiralados es decir con la pared secundaria en forma de espiral y también anillados.

Respecto a contenidos celulares no se observó almidón que es propio de los órganos de reserva como raíces y ausente en hojas y tallos.

No se observó tampoco gotas de grasa, reserva energética propio de semillas y frutos..

Granos de polen redondos tricolpados (→), es decir con tres poros germinativos, y con la exina verrugosa o tal vez equinulada.

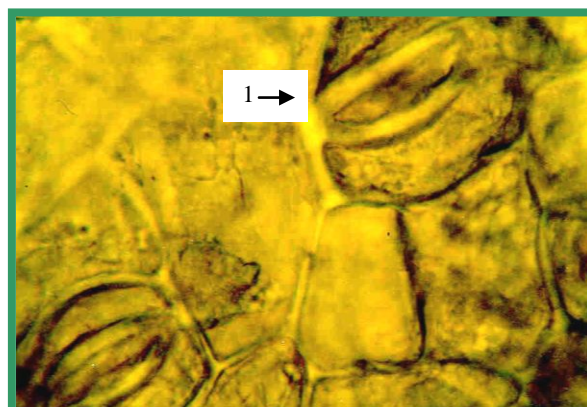


1.2 *Phoradendron crassifolium*

En el examen micrográfico realizado sobre la sumidad florida de *Phoradendron crassifolium*, destacan:

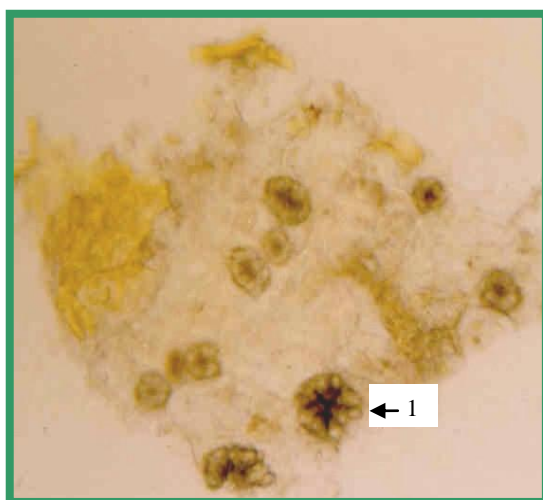
Elementos celulares: Como elementos celulares celulósicos se ha observado epidermis formada por grandes células poligonales cubiertas de gruesa cutícula y estomas, propio de hojas.

Los estomas paracíticos(1), pues las dos células accesorias tienen su pared común paralela a la línea central de la apertura estomáquica.



En cuanto a elementos celulares lignificados se han observado vasos anillados y espiralados(1) de pequeño calibre y mas o menos lignificados, propio de órganos poco desarrollados como son las hojas.

Se han observado como elementos de resistencia células pétreas o esclereidas poliédricas (2) con los vértices muy marcados y agrupadas, con su contenido celular muy reducido debido a la pared muy engrosada en lignina, que proporcionan rigidez como tejido de sostén de la planta.



Respecto a contenidos celulares no se observa almidón mas propio de raíces, pero si cristales de oxalato cálcico, que son residuos metabólicos almacenados por la planta, en este caso se observan restos de parénquima con drusas (1), que son maclas en forma de roseta y que se localizan principalmente en las hojas.

No se observan sustancias oleosas de reserva propias de semillas y frutos, ni

aceites esenciales. Granos de polen tricolpados, de pared lisa.

1.3. *Tuberaria lignosa*

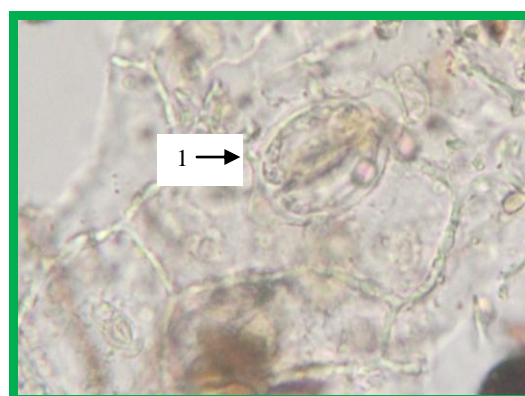
En el examen micrográfico realizado sobre la sumidad florida de *Tuberaria lignosa* se observan:

Elementos celulares: Respecto a elementos celulares celulósicos:

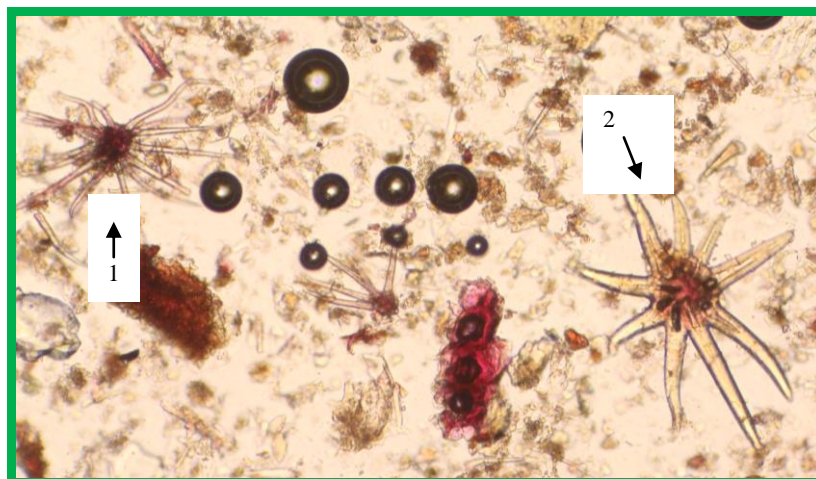
- epidermis con las paredes celulares finas, recubiertas de cutina y poligonales, además se aprecian los estomas(1), con las células anejas que delimitan el ostiolo de forma reniforme propia de las hojas en dicotiledóneas.

Se observan abundantes tricomas, de cutina

lisa, son pelos tectores, unicelulares con forma tubular o acicular, de tamaños variados, grandes, pertenecientes a los bordes de las hojas basales y mas pequeños



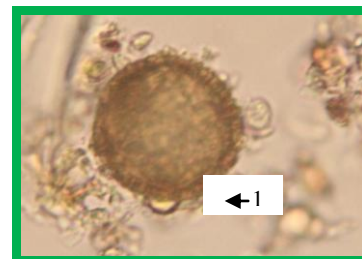
que cubren la parte basal el tallo y la superficie de las hojas. También se observan pelos pluricelulares, aquí cabe diferenciar entre los que presentan sus células en filas de 2-4 células, y los que son ramificados, ya que estos últimos, son elementos diferenciadores y patognomónicos de la especie *T. lignosa* como ya mencionamos en la descripción botánica dada por Flora ibérica. Se trata de dos tipos de pelos, estrellados (1), que revisten el envés de las hojas y pelos escamosos de perfil estrellado (2) que tapizan el haz de las hojas.



En cuanto a elementos celulares lignificados, observamos vasos estrechos (protoxilema) y enteros procedentes de hoja y tallo, espiralados y anillados.

Al ser esta droga parte aérea y por tanto no considerado como órgano de reserva no se observó almidón al teñir con agua de yodo. No se observó tampoco sustancias oleosas de reserva energética propio de semillas y frutos, ni tampoco aceites esenciales.

Granos de polen redondos y aparentemente monocolpados (1), con la exina mas o menos lisa.



2. Rendimiento de los extractos

Los rendimientos que se obtuvieron para cada una de las especies vegetales objeto de estudio se muestran en la tabla 1 y se expresa en %(p/p), porcentaje de peso del extracto obtenido respecto del peso de la planta pulverizada.

Nombre botánico	Rendimientos extracto acuoso, A (%)	Rendimientos extracto etanólico, B (%)
<i>Satureja boliviiana</i>	24,2	12,1
<i>Phoradendron crassifolium</i>	30,9	4,1
<i>Tuberaria lignosa</i>	21,1	14

3. Actividad antiviral de los extractos

En principio, la elección de los extractos y del proceso de fraccionamiento queda ligado a los resultados de actividad que nos proporcionan los ensayos antivirales.

Tras realizar un primer fraccionamiento según se describe en material y métodos (pag. 151, preparación de los extractos), se procedió a valorar la actividad antiviral tanto del extracto acuoso como del etanólico.

3.1. Actividad antiviral de los extractos etanólicos

Respecto a los extractos etanólicos, ninguno de ellos resultó ser activo frente a nuestra batería de virus, siendo además tóxico en el rango de concentraciones ensayado. Por tanto la actividad antiviral reside únicamente en los extractos acuosos.

3.2. Actividad antiviral de los extractos acuosos

3.2.1 Actividad antiviral sobre VHS (DNA virus):

La actividad antiviral se determinó mediante el test de protección de ECP sobre células HeLa. Como control positivo para la realización de los ensayos de actividad antiviral se ha utilizado λ -carragenina, sustancia con actividad demostrada contra VHS.

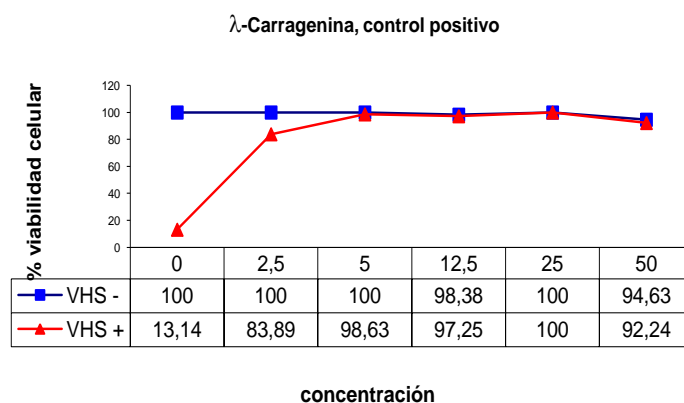


Figura 64. Actividad anti-VHS de λ -Carragenina (control positivo)

El extracto acuoso de *Phoradendron crassifolium*, fue efectivo contra VHS en un rango de concentraciones que va desde 125 a 500 $\mu\text{g/mL}$ recuperando hasta un 70% de las células infectadas, y con un valor de IC_{50} : 48,09 μM

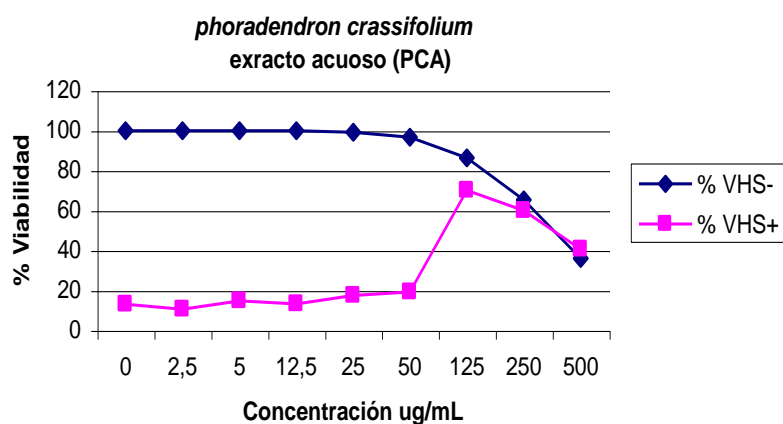


Figura 65. Actividad anti-VHS y citotoxicidad de diferentes concentraciones del extracto acuoso de *Phoradendron crassifolium*. Ensayo ECP en células HeLa infectadas y no infectadas

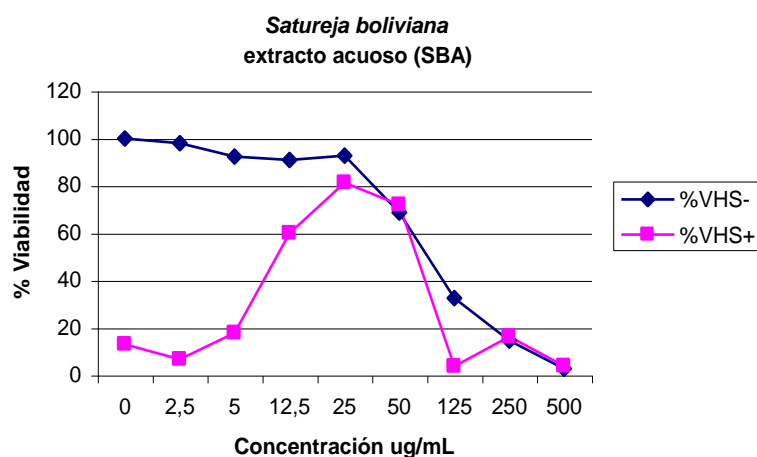


Figura 66. Actividad anti-VHS y citotóxicidad de diferentes concentraciones del extracto acuoso de *Satureja boliviana*. Ensayo ECP en células HeLa infectadas y no infectadas

El extracto acuoso de *Satureja boliviana* presentó mejores resultados con una actividad antiviral en un rango de 10 a 50 $\mu\text{g/mL}$ y un IC_{50} 15 μM , aunque algo mas tóxico que el extracto anterior. Llega a recuperar mas del 80% de las células infectadas a 25 $\mu\text{g/mL}$.

3.2.2 Actividad antiviral sobre VSV (RNA virus): La actividad antiviral se determinó mediante el test de protección de ECP sobre células HeLa. Como control positivo para la realización de los ensayos de actividad antiviral se ha utilizado el extracto etanólico

de *chirantodendron pentadactylon* (Sterculaceae) CP2, con actividad sobradamente demostrada contra VSV (Abad et al., 1997).

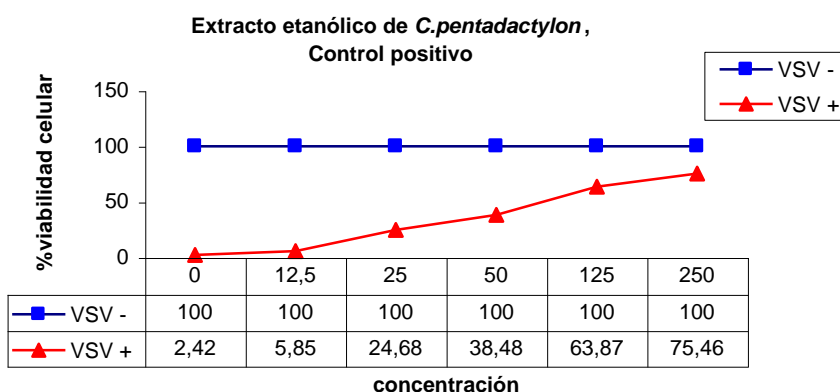


Figura 67. Actividad anti-VHS de *chirantodendron pentadactylon* (control positivo)

El extracto acuoso de *Satureja boliviana* presentó una clara actividad antiviral frente a VSV, en un rango de concentraciones que va desde 50 a 250 µg/mL. Se observa una ligera toxicidad, pero recupera más del 60% de las células infectadas, IC₅₀: 18,49 µM

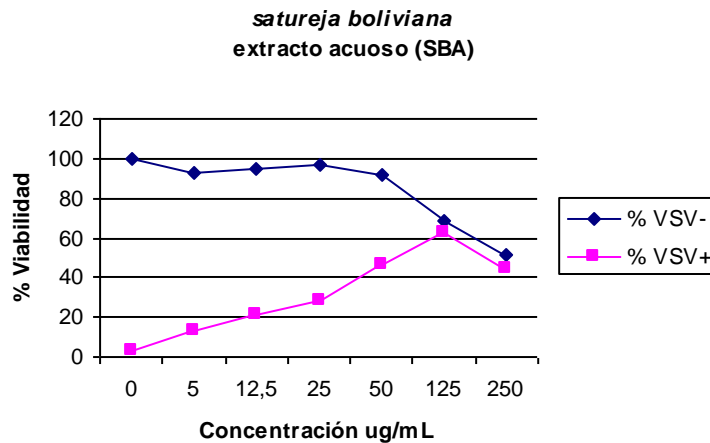


Figura 68. Actividad anti-VSV y citotoxicidad de diferentes concentraciones del extracto acuoso de *Satureja boliviana*. Ensayo ECP en células HeLa infectadas y no infectadas con el virus de la estomatitis vesicular

El extracto acuoso de *Phoradendron crassifolium*, no presenta actividad antiviral frente a VSV en el rango de concentraciones ensayado.

3.2.3 Actividad antiviral frente al virus de la polio: La actividad antiviral se determinó mediante el test de protección de ECP sobre células HeLa. Como control positivo para los ensayos de actividad antiviral se ha utilizado el flavonoide, Ro-090179.

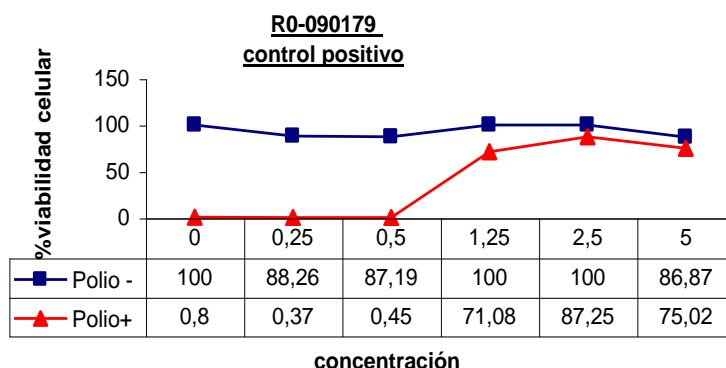


Figura 69. Actividad anti-VHS de R-090179 (control positivo)

A una concentración que va desde 1 a 5 $\mu\text{g/mL}$, el flavonoide Ro-090179, inhibe la replicación del poliovirus en un 100%. No obstante, ninguno de los extractos obtenidos de *P. crassifolium* ni *S. boliviiana*, presenta actividad contra el virus de la polio.

3.2.3 Actividad antiviral frente a VIH:

Para la valoración de la actividad antiVIH y de la capacidad citotóxica se calculó el porcentaje de viabilidad celular mediante el ensayo MTT en células MT-2. Como control positivo se emplearon los antirretrovirales, Zidovudina (AZT), y Nelfinavir.

El extracto acuoso de *Tuberaria lignosa* presentó una clara actividad antiviral frente a VIH, en un rango de concentraciones que va desde 20 a 50 $\mu\text{g/mL}$. Se observa una ligera toxicidad, pero recupera más del 60% de las células infectadas, IC₅₀: 37,15 μM

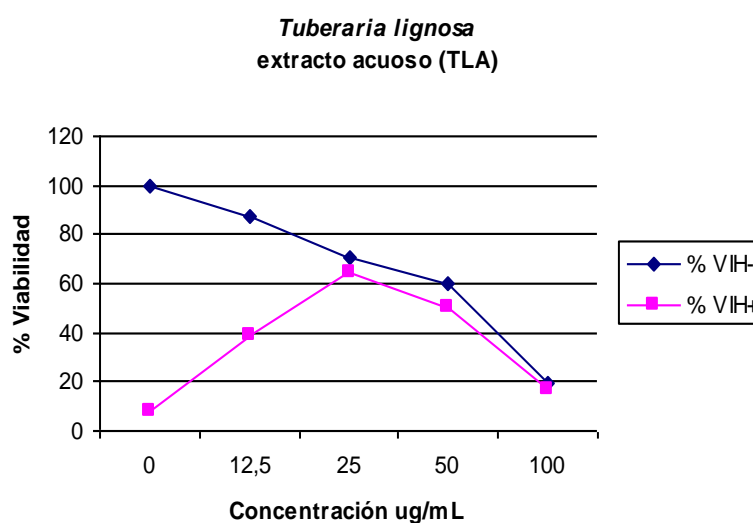


Figura 70. Actividad antiVIH y citotoxicidad. de diferentes concentraciones del extracto acuoso de *Tuberaria lignosa* Ensayo MTT en células MT-2 infectadas y no infectadas con la cepa de VIH NL4.3

El extracto etanólico de *Tuberaria lignosa* presentó actividad antiviral frente a VIH aunque en menor medida que el extracto acuoso, el rango de actividad se sitúa en torno a concentraciones que van desde 25 a casi 100 µg/mL. No se observa casi toxicidad, y se recuperan mas del 60% de las células infectadas, IC₅₀: 34,19 µM

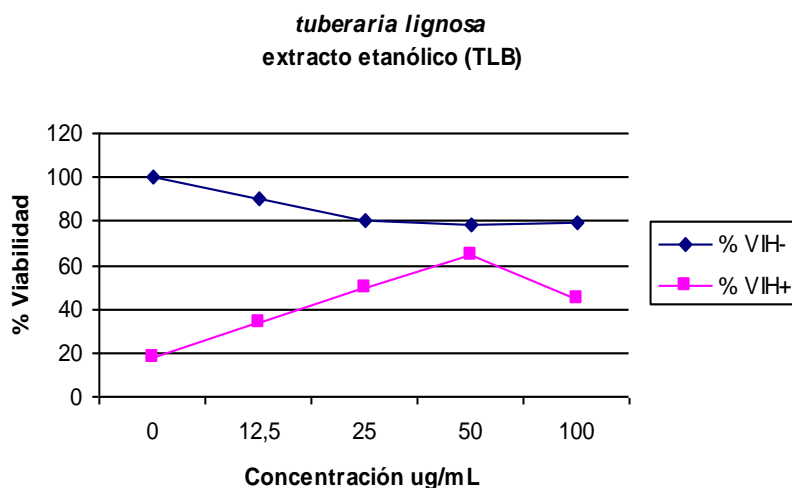


Figura 71 . Actividad anti-VIH y citotoxicidad. de diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Tuberaria lignosa* Ensayo MTT en células MT-2 infectadas y no infectadas con la cepa de VIH NL4.3

4. Fraccionamiento de los extractos acuosos

Los liofilizados acuosos activos, SBA, PCA y TBA se sometieron a un proceso de extracción con alcohol de 70°, obteniendo dos fracciones: una fracción soluble y una fracción precipitada. Los resultados de este proceso aparecen reseñados en el cuadro a continuación.

Nombre botánico	Rendimientos extracto soluble en etanol 70° (%)	Rendimientos extracto insoluble en etanol 70° (%)
<i>Satureja boliviana</i>	SBA0: 15,7	SBA1: 84,3
<i>Phoradendron crassifolium</i>	PCA0: 40	PCA1: 60
<i>Tuberaria lignosa</i>	TLA0: 71,3	TLA1: 29,7

En vista de los resultados de actividad obtenidos en el primer ensayo y para hacer el seguimiento de la actividad antiviral, se ensayan los extractos de *Phoradendron crassifolium* en VHS, de *Satureja boliviana* en VSV y de *Tuberaria lignosa* en VIH. Utilizando nuevamente el método ECP, para VHS y VSV y MTT para VIH.

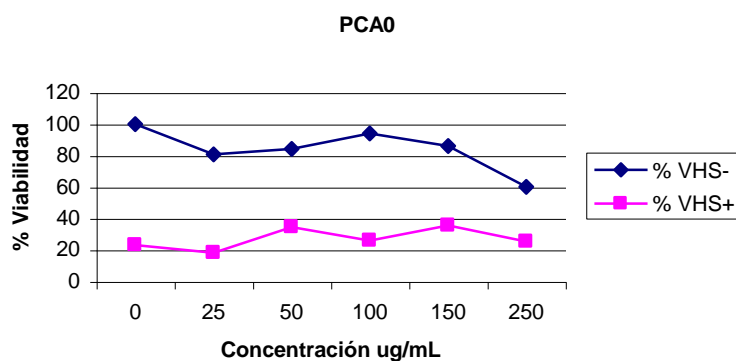


Figura 72. Actividad anti-VHS y capacidad citotóxica de la fracción soluble en etanol 70° de *p. crassifolium*

La fracción de *Phoradendron crassifolium* soluble en etanol 70° prácticamente no presenta actividad antiviral en el rango de concentraciones ensayado y en lo que respecta a la citotoxicidad es ligeramente mas citotóxico que el extracto acuoso, a concentraciones de 25µg/mL con un 80 % viabilidad, manteniéndose esa viabilidad hasta concentraciones de 150µg/mL donde cae hasta el 60%.

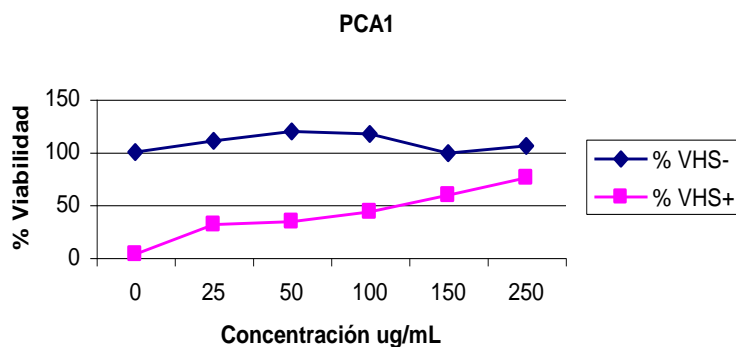


Figura 73. Actividad anti-VHS y capacidad citotóxica de la fracción insoluble en etanol 70° de *p. crassifolium*

La fracción precipitada de *p. crassifolium* en etanol 70°, presenta una clara actividad antiviral frente al VHS-1, a partir de 125 µg/mL, IC50:148µM llegando a recuperar hasta un 75% de las células infectadas sin toxicidad en todo el rango de concentraciones ensayado.

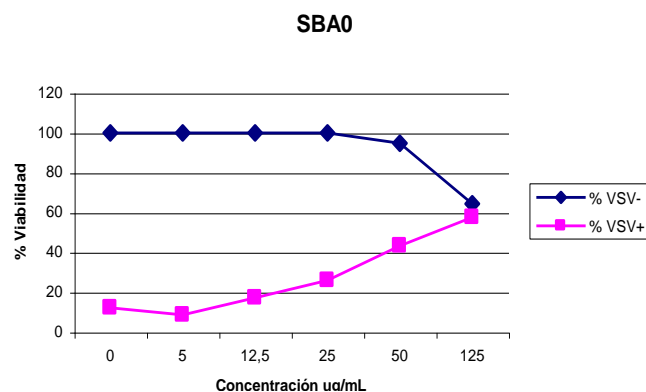


Figura 74 Actividad anti-VSV y capacidad citotóxica de la fracción soluble en etanol 70° de *s. boliviana*

Observamos como la fracción de *s. boliviiana* soluble en etanol 70°, es activa frente a VSV, en el rango de concentraciones establecido desde 10 hasta 130 $\mu\text{g/mL}$ aproximadamente, llegando a recuperar hasta un 60% de células infectadas. IC50: 49,65 μM

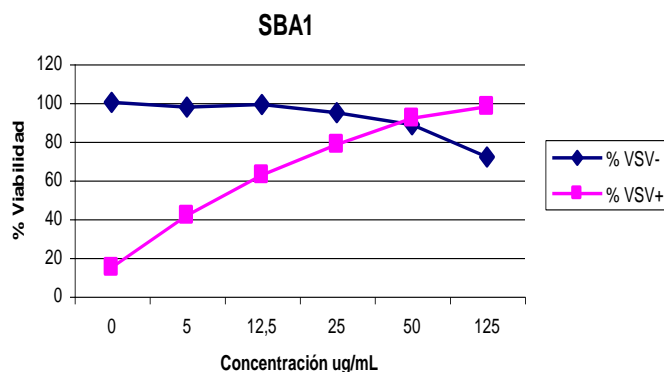
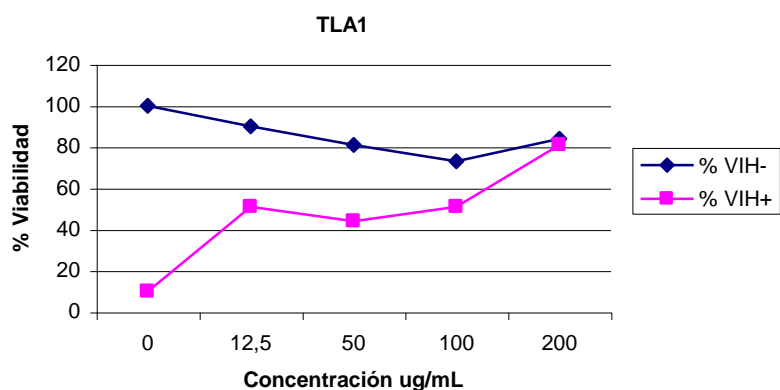


Figura 75. Actividad antiVSV y capacidad citotóxica de la fracción insoluble en etanol 70° de *s. boliviiana*

Sin embargo, la fracción que precipita en alcohol 70° resulta ser mucho mas activa frente a VSV en todo el rango de concentración establecido desde 5 a 125 $\mu\text{g/mL}$, llegando a recuperar un 98% de células infectadas. IC50: 9,6 μM

En cuanto a la valoración de la actividad anti-VIH de *Tuberaria lignosa* podemos decir los dos extractos presentan una actividad antiviral similar en el intervalo de concentraciones estudiado, aunque cabe destacar que la fracción soluble en etanol 70° con un IC50: 31,50 μM , describe cierta toxicidad en 60,15 $\mu\text{g/mL}$, mientras que para la fracción insoluble no se detecta a 100 $\mu\text{g/mL}$, valor máximo analizado, y cuyo valor de IC50 es 40,33 μM



Figuras 76 y 77. Actividad anti-VIH y capacidad citotóxica de la fracción soluble e insoluble en etanol 70° de *T. lignosa*, mediante ensayo MTT en células MT2 infectadas o no con la cepa NL4.3 de VIH.

5. Estudio fitoquímico previo

Se realizaron una serie de ensayos previos con el fin de tener una primera visión de la composición de los extractos y naturaleza de la muestra.

5.1 Determinación de Carbohidratos Totales por el método del Fenol sulfúrico

Preparamos de cada muestra cantidad suficiente a una concentración 1mg/mL.

Infusión	ug galactosa		ug/uL		X (ug/uL)
Satureja boliviana SBA	100uL	12,65	100uL	0,126	0,141
	300uL	55,21	300uL	0,1577	
Phoradendron crassifolium PCA	100uL	17,07	100uL	0,17	0,165
	300uL	55,27	300uL	0,16	
Tuberaria lignosa TLA	100uL	13,94	100uL	0,139	0,120
	300uL	34,57	300uL	0,10	

Fracción pptada en etanol 70º	ug galactosa		ug/uL		X (ug/uL)
Satureja boliviana SBA1	100uL	28,8	100uL	0,288	0,261
	300uL	82,44	300uL	0,2355	
Phoradendron crassifolium PCA1	100uL	32,92	100uL	0,32	0,313
	300uL	107,1	300uL	0,306	
Tuberaria lignosa TLA1	100uL	19,5	100uL	0,195	0,207
	300uL	76,49	300uL	0,22	

5.2 Determinación de proteínas por el método de Lowry

Preparamos de cada muestra cantidad suficiente a una concentración 1mg/mL.

Infusión	ug proteína		ug/uL		X (ug/uL)
Satureja boliviana SBA	10uL	0	10uL	0	0,29
	50uL	14,8	50uL	0,29	
Phoradendron	10uL	0	10uL	0	

<i>crassifolium</i> PCA	50uL	15,45	50uL	0,309	0,309
<i>Tuberaria lignosa</i> TLA	10uL	0	10uL	0	0,5
	50uL	28,65	50uL	0,5	

Fracción pptada en etanol 70°	ug proteína		ug/uL		X (ug/uL)
<i>Satureja boliviana</i> SBA1	10uL	0	10uL	0	0,08
	50uL	4,25	50uL	0,08	
<i>Phoradendron crassifolium</i> PCA1	10uL	0	10uL	0	0,038
	50uL	1,93	50uL	0,038	
<i>Tuberaria lignosa</i> TLA1	10uL	0	10uL	0	0,14
	50uL	7,4	50uL	0,14	

Según vemos en los análisis de proteínas podemos observar como si bien en la infusión donde suponemos se ha perdido algo de proteínas todavía aparecen, en el proceso de extracción con etanol disminuyen notablemente.

5.3 Determinación de ácidos urónicos por el método de Carbazol.

Preparamos de cada muestra cantidad suficiente a una concentración 1mg/mL.

Infusión	ug ac. urónicos		ug/uL		X (ug/uL)
<i>Satureja boliviana</i> SBA	150uL	0,6262	150uL	0,0041	0,0058
	600uL	4,46	600uL	0,0075	
<i>Phoradendron crassifolium</i> PCA	150uL	1,838	150uL	0,01225	0,01232
	600uL	7,495	600uL	0,0124	
<i>Tuberaria lignosa</i> TLA	150uL	1,646	150uL	0,010	0,0094
	600uL	5,29	600uL	0,0088	

Fracción pptada en etanol 70°	ug ac. urónicos		ug/uL		X (ug/uL)
<i>Satureja boliviana</i> SBA1	150uL	1,1818	150uL	0,00788	0,0107
	600uL	8,20	600uL	0,0136	
<i>Phoradendron</i>	150uL	2,343	150uL	0,01874	

<i>crassifolium</i> PCA1	600uL	10,475	600uL	0,01745	0,01809
<i>Tuberaria lignosa</i> TLA1	150uL	1,96	150uL	0,013	0,0115
	600uL	6,051	600uL	0,010	

De los tres ensayos deducimos que en el rendimiento del proceso se consigue una mayor cantidad de azúcares.

A la vista de los resultados podemos decir que estamos en el camino de conseguir el aislamiento de azúcares y que el resto de material lo vamos eliminando.

6.- Cromatografía en capa fina

La cromatografía en capa fina nos ha dado una idea sobre la composición en azúcares que formaban parte de los extractos. El comportamiento de las fracciones en las distintas pruebas cromatográficas nos ha ayudado a fijar los solventes y las condiciones idóneas para obtener un mejor fraccionamiento y análisis de las mismas. Hidrolizamos con trifluoroacético 2M a 120° durante 1,30 min y 3 h, los extractos SBA1, PCA1 y TLA1. Después de probar con distintos solventes, fases móviles y reveladores para optimizar el resultado, nos quedamos con los siguientes ensayos obteniendo para las tres muestras resultados similares, aunque ligeramente distintos en la cantidad de los monosacáridos, ya que en las muestras SBA1 se aprecia como azúcar principal la glucosa y quizás mayor proporción de ácido galacturónico, que en las muestras TLA1 y PCA1 donde la arabinosa parece ser el azúcar principal, y parece que se aprecia menor proporción de ácido galacturónico.

- Cromatofolios AL TLC de sílica–gel 60, cuya fase móvil estaba compuesta por: acetato de etilo: acético: metanol: agua (18:4,5:4,5:3). Se procedió a revelar con timol sulfúrico, y se utilizaron como patrones de azúcares los mas comunes: Glucosa, sacarosa, celobiosa, trehalosa, galactosa, manosa, arabinosa, maltosa, sacarosa, xilosa, ramnosa, ácido galacturónico y acido glucurónico. Finalmente se determinó la existencia de glucosa, galactosa, maltosa, xilosa, ramnosa, arabinosa y ac. galacturónico.
- Cromatofolios AL de celulosa F para CCD, fase móvil: acetato de etilo: piridina: agua, (2:1:2) revelador ftalato de p-anisidina
En esta se determina la existencia de arabinosa, glucosa, xilosa, galactosa, quizás ramnosa , y ac galacturónico, no siendo así para ac glucurónico, sacarosa, ribosa, fructosa, maltosa, celobiosa, trehalosa ni rafinosa.

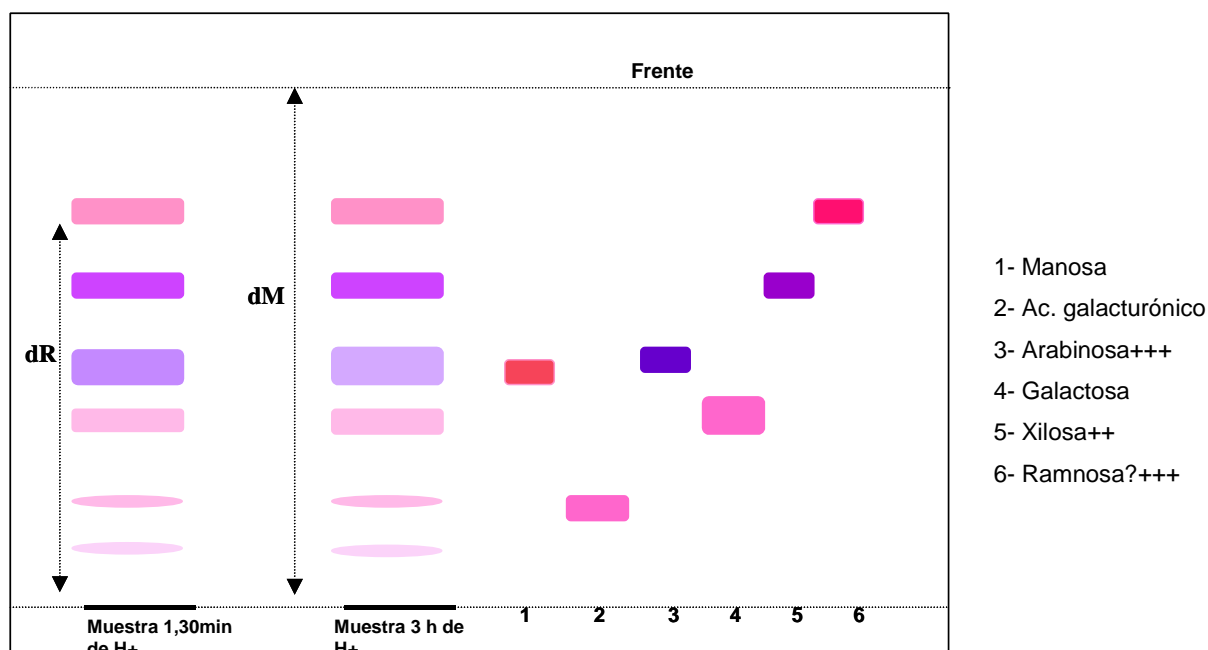


Figura 78. Dibujo representativo de la CCD de la hidrólisis con TFA 2M de los extractos insolubles o que precipitan con etanol 70°, SBA2, PCA2 y TLA2, en cromatofolio de celulosa, con fase móvil: acetato de etilo:piridina:agua (2:1:2).

Factor de retraso (RF)= dR/dM

dR: Distancia lineal recorrida por el analito desde el punto de aplicación

dM: Distancia lineal recorrida por el frente del disolvente desde el punto de aplicación del analito.

	Monosacáridos	Rf
Aldohexosas	Manosa	0,32
	Galactosa	0,23
	Ramnosa	0,49
Ac. aldohexurónico	Ac galacturónico	0,025
Aldopentosas	Xilosa	0,38
	Arabinosa	0,33

En las dos placas los resultados tanto la hidrólisis de 1,30 min, como la de 3 h son similares. En la muestra sin hidrolizar podemos deducir si los posibles disacáridos y oligosacáridos que tenemos inicialmente se han eliminado con la precipitación con etanol y por tanto comprobamos que es una buena extracción para polisacáridos, efectivamente las muestra no hidrolizadas no presentan azúcares. A la vista de los resultados podemos decir que el eluyente utilizado sería correcto ya que ha separado

las aldohexosas y pentosas y los ácidos urónicos selectivamente, se trata de extractos compuestos mayoritariamente de polisacáridos que han sido bien extraídos, y cuya composición aproximada en monosacáridos sería: Glucosa, arabinosa, manosa, galactosa, xilosa, ramnosa y ácido galacturónico.

7.- Reacción con CETAVLON

Seguimos el método propuesto por Zhang y cols. (Zhang, Y. et al., 1997). Este método se fundamenta en la separación de la fracción glucídica en base a la acidez de la molécula. Se basa en que los polisacáridos fuertemente ácidos, como la pectina o el ácido algínico, precipitan al añadir a la solución sales de amonio cuaternario, por lo que podemos separarlos de los neutros. La sal de amonio utilizada fue el bromuro de cetiltrimetilamonio o Cetavlon®. Los precipitados que fuimos obteniendo se redisolvió en agua y se dializaron. Obtuvimos supuestamente de cada extracto una fracción fuertemente ácida, otra débilmente ácida y otra neutra.

Rendimiento de las fracciones:

Rendimientos (%)	Fuertemente ácida(%)	Débilmente ácida(%)	Neutra (%)
<i>Satureja boliviana</i>	SBA-2: 16,6	SBA-3: 7,9	SBA-4: 4,9
<i>Phoradendron crassifolium</i>	PCA-2: 8,1	PCA-3: 5,91	PCA-4: 7,2
<i>Tuberaria lignosa</i>	TLA-2: 67,1	TLA-3: 2,60	TLA-4: 3,26

8. ANÁLISIS QUÍMICO

Se realizaron una serie de reacciones cualitativas previas, encaminadas a determinar si los compuestos aislados presentaban algún componente fenólico y, en este caso, de qué tipo era.

8.1. Ensayos cualitativos de sustancias fenólicas

Este ensayo se realizó sobre los extractos en acetona al 70% de TL, PC y SB y de las nueve muestras resultantes del tratamiento con Cetavlon, TLA-2, TLA-3, TLA-4, PCA-2, PCA-3, PCA-4 y SBA-2, SBA-3, SBA-4.

8.1.1. Reacción con sales de hierro (FeCl₃) y nitrito sódico (NaNO₂)

En las muestras no tratadas con Cetavlon se produjo un cambio de coloración a azul oscuro tras la adición del reactivo de tricloruro de hierro (FeCl₃) al 1% en metanol, indicando que todas ellas contienen fenoles. Sin embargo, al evaluar el contenido

fenólico de las nueve fracciones obtenidas por precipitación con Cetavlon, la reacción resultó positiva solo para SBA-4. La reacción negativa de SBA-4 (ausencia de coloración naranja) tras la adición de una solución acuosa de NaNO_2 (0,1%) indicó que dicho fenol no era ácido elágico.

8.1.2.Reacción de Stiasny

Esta es una reacción específica de taninos catéquicos. En este medio ácido los taninos catéquicos no se hidrolizan y en presencia de formol forman polímeros que precipitan en forma de masas algodonosas denominadas flobáfenos. El ensayo fue realizado con la única muestra tratada en la que se detectó presencia de fenoles, el extracto acuoso de SBA-4, utilizando como control positivo el extracto no tratado (SB). El resultado del ensayo fue negativo, por lo que se puede afirmar que en la extracción se han eliminado los taninos, posiblemente durante la diálisis.

8.1.3.Reacción de la cianidina

Esta reacción se basa en la reducción de los flavonoides a antocianidinas acompañadas de cambio en la coloración rosa-violeta, por la acción del hidrógeno desprendido al hacer reaccionar virutas de Mg con HCl. En este caso utilizamos el mismo control, un extracto acetónico al 70%. Diluimos la muestra en agua y etanol 96° y a continuación se añade magnesio en virutas y tratamos con HCl 1/3. En todas las muestras se percibe un leve cambio de color a azulado, lo que sugiere que las muestras pueden contener algún flavonoide.

En resumen, tras los ensayos cualitativos para la detección de compuestos fenólicos, solo detectamos la presencia posiblemente de algún flavonoide, pero no taninos elágicos, ni catequinas.

8.2. Análisis de la composición de las fracciones precipitadas con Cetavlon.

8.2.1. Determinación de azúcares neutros totales.

Se determinó la concentración de azúcares totales en las muestras mediante el método de la Antrona (Tabla 4). Las muestras contienen una baja concentración de carbohidratos neutros, o no los contienen como en el caso de la fracción SBA-3. El valor elevado detectado en SBA-4 se debió probablemente a la interferencia en la reacción colorimétrica de algún compuesto presente en la muestra, ya que la reacción se tiñó de rosa al añadir el reactivo de antrona.

Muestra	Carbohidratos neutros (%)
PCA-2	2,0
PCA-3	2,1
PCA-4	21,0
TLA-2	2,5
TLA-3	1,5
TLA-4	10,1
SBA-2	3,9
SBA-3	0,0
SBA-4	25,2

Tabla 4. Determinación de azúcares neutros totales en las muestras tratadas con Cetavlon.

8.2.2. Resonancia magnética nuclear de protón (^1H -RMN).

Se registraron espectros de ^1H -RMN de todas las fracciones obtenidas por precipitación fraccionada con Cetavlon. Es conveniente destacar que la RMN es una técnica de alta resolución, pero de baja sensibilidad para moléculas grandes (como puedan ser polisacáridos) y que en los espectros sólo se observan las señales derivadas del material soluble, ya que el material insoluble se elimina por centrifugación antes del análisis. En nuestro caso, las muestras resultaron ser bastante insolubles en agua y finalmente fueron disueltas en NaOH deuterada.

En muchos espectros se observaron señales atribuibles a glicerol y una tendencia ascendente en la línea base del espectro, lo que nos hace pensar en la presencia de lípidos. Además también se encuentran restos de proteína en todas las muestras, excepto en TLA-2 y TLA-3. Las señales de carbohidrato en las fracciones ácidas de los tres extractos (fracciones -2 y -3) fueron muy tenues o incluso nulas en el caso de SBA-3, lo que concuerda con la valoración de carbohidratos neutros totales. En el espectro de las fracciones neutras, TLA-4, SBA-4 y PCA-4, se observan señales más intensas en la región anomérica de los carbohidratos (4,5-6 ppm), indicando que probablemente contienen más polisacáridos. En la Figura 79, se muestran los espectros de ^1H -RMN de las fracciones precipitadas con Cetavlon a partir de los extractos.

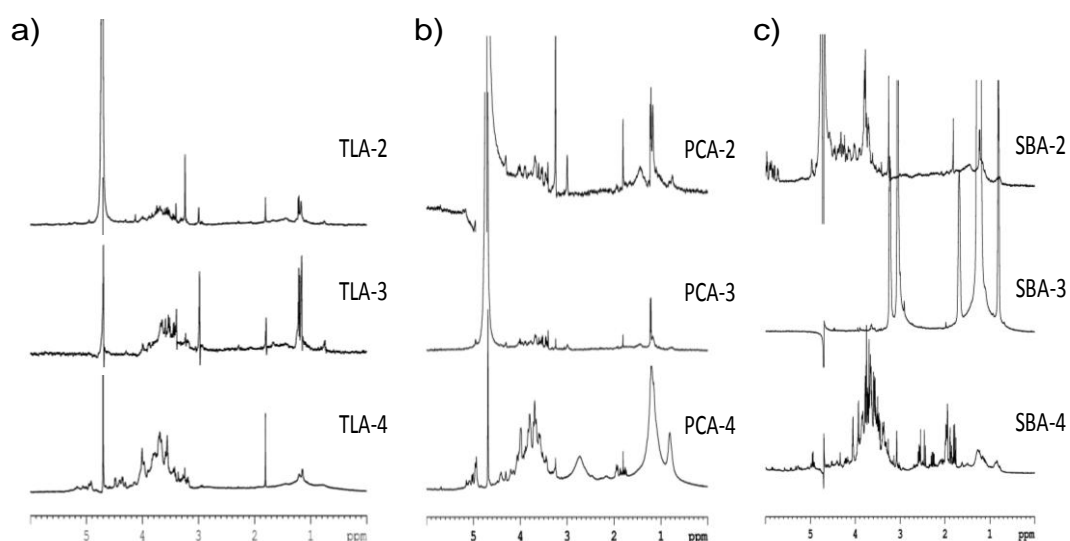


Figura 79. Espectros de ^1H -RMN de las fracciones resultantes de los tratamientos con Cetavlon. a) TLA-2, 3 y 4; b) PCA-2, 3 y 4; c) SBA-2, 3 y 4.

8.2.3. Cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM). Las muestras que contenían carbohidratos, TLA-2, TLA-3, TLA-4, PCA-2, PCA-3, PCA-4, SBA-2, SBA-3 y SBA-4 fueron sometidas a hidrólisis ácida para despolimerizarlas e intentar identificar sus componentes. Para su análisis cromatográfico (CG-EM) es preciso transformar químicamente los monómeros liberados en el proceso hidrolítico, que generalmente no son volátiles, en derivados volátiles susceptibles de ser analizados mediante esta técnica. En primer lugar, se prepararon y analizaron los acetatos de alditol derivados de cada una de las muestras, para confirmar la presencia de monosacáridos neutros y se calcularon las proporciones relativas entre los componentes. En la mayoría de los casos se detectó arabinosa, glucosa, galactosa, manosa y ramnosa (Tabla 5), con la única excepción de la fracción SBA-3 que, tal y como era de esperar, no contenía monosacáridos.

Monosacárido	PCA			TLA			SBA		
	2	3	4	2	3	4	2	3	4
Ramnosa	0,0	0,3	0,0	0,0	0,2	0,1	0,0	0,0	0,0
Arabinosa	1,9	1,7	1,8	1,2	0,6	0,7	2,6	tr.	1,0
Xilosa	0,0	0,2	0,1	0,0	0,3	0,4	1,0	0,0	0,0
Manosa	0,0	0,0	0,5	0,0	0,4	0,5	0,0	0,0	2,0
Glucosa	1,4	0,7	1,8	2,5	0,8	0,8	1,2	0,0	10,4
Galactosa	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	tr.	1,0

Tabla 5. Proporciones molares de monosacáridos neutros presentes en las fracciones de muestras tratadas con Cetavlon.

Puesto que los acetatos de alditol no son adecuados para detectar otros compuestos posiblemente presentes en las muestras, se derivatizaron los monómeros liberados en la hidrólisis a sus correspondientes trimetilsilil (TMS) oximas o TMS-derivados permitiendo, como veremos más adelante, la detección de ácido galacturónico y la identificación de algunos componentes no glucídicos.

La tabla 6 recoge los tiempos de retención de los compuestos detectados en el análisis cromatográfico y en los casos en que fue posible, la identificación de los mismos. La mayoría de las muestras analizadas contenían arabinosa, glucosa, galactosa, manosa, ramnosa y ácido galacturónico pero en distintas proporciones, diferenciándose entre las fuertemente ácidas, débilmente ácidas y neutras principalmente por su proporción decreciente de ácido galacturónico. El análisis cromatográfico reveló, además, la existencia de otros compuestos no glucídicos en las muestras, que fueron identificados mediante la comparación de sus espectros de masas con los recogidos en la base de datos Wiley-NIST08 como ácido azelaico, subérico y palmítico en las muestras TL y PC. Entre otros compuestos, se detectan ácidos grasos procedentes, probablemente, de las paredes celulares de tejidos epidérmicos. En la Figura 80, se muestran, como ejemplo, los cromatogramas correspondientes al análisis de las tres fracciones neutras.

Identificación	Tiempo de retención (min)	PCA			TLA			SBA		
		2	3	4	2	3	4	2	3	4
Ác. subérico	4,44	+				+	+			
No identificado	4,55		+	+		+	+	+	+	
Arabinosa	5,50		+	+		+	+	+	+	+

Arabinosa	5,66		+	+		+	+	+	+
Ác. azelaico	5,80	+	+	+		+	+		
No identificado	5.90							+	
Ramnosa	6,63		+	+		+	+	+	
Ác. clorogénico	7,36			+					+
No identificado	8.30		+						
No identificado	8.59								+
No identificado	8.94								+
No identificado	9,12		+						+
No identificado	9,52								+
No identificado	9,66								
No identificado	9,78	+				+	+		
Manosa	10,43			+		+	+	+	+
Galactosa	10,50			+		+	+	+	+
Glucosa	10,72			+		+	+	+	+
Ác. Palmítico	10,95		+	+		+	+		+
No identificado	11,18							+	
Monosacáridos	11,21					+	+	+	+
Ác. galacturónico	11,88					+	+		+
No identificado	12.52		+					+	

Tabla 6. Identificación cromatográfica de CG-EM de algunos compuestos presentes en las fracciones de muestras tratadas con Cetavlon.

Cabe destacar que en la muestra SBA-4 no se observaron los ácidos anteriormente mencionados. Sin embargo, el espectro de masas del pico eluido a los 7,36 min sugiere que este componente es un ácido aromático, que podría ser del tipo del ácido clorogénico, compuesto fenólico no volátil, formado por la esterificación de los ácidos quínico y *p*-cumárico (un ácido cinámico). Probablemente este era el compuesto fenólico, no de tipo tanino, que detectamos cualitativamente en el ensayo con sales de hierro para la determinación de sustancias fenólicas.

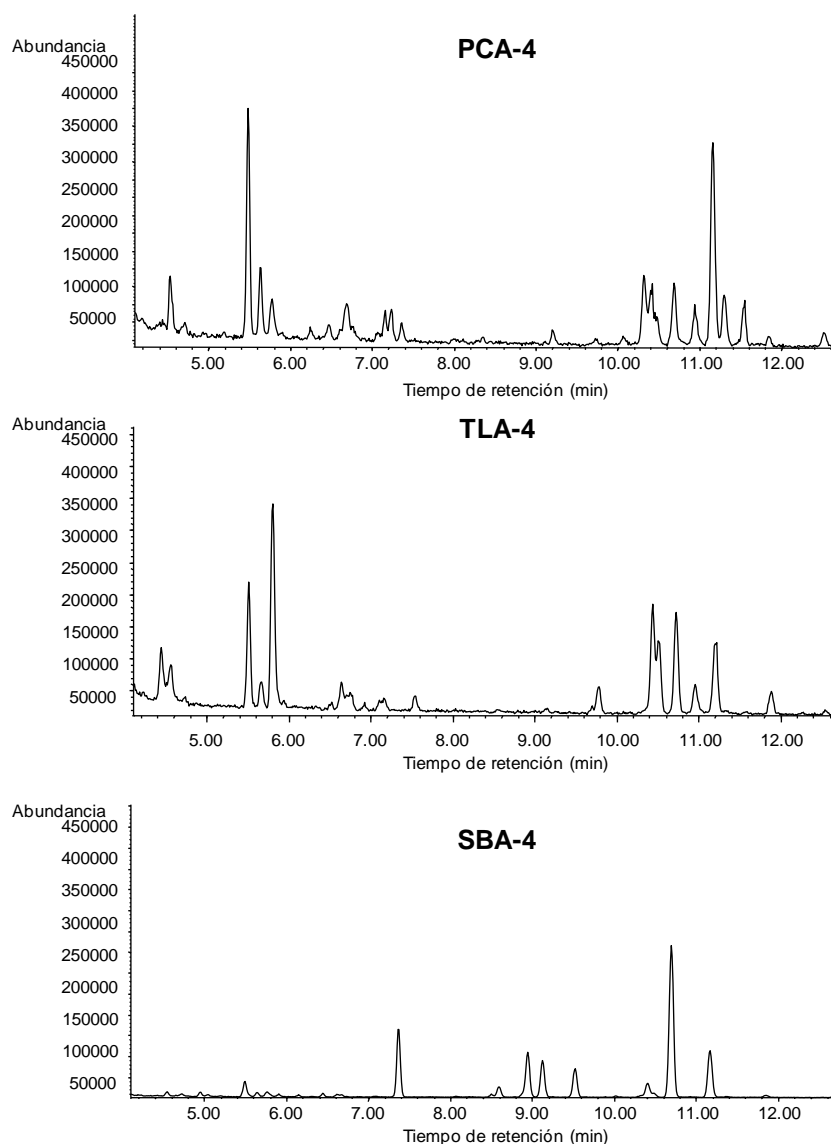


Figura 80. Análisis mediante CG-EM de las fracciones neutras resultantes del fraccionamiento por Cetavlon.

8.2.4. Cromatografía de exclusión molecular de las fracciones neutras. Análisis de las fracciones purificadas por ^1H -RMN y GC y evaluación de su actividad biológica.

Para comprobar si las fracciones estaban constituidas por uno o varios polímeros y en su caso, tratar de separarlos en función de su tamaño molecular, las fracciones neutras se disolvieron en NaOH 0,3M y se centrifugaron. Como veremos más adelante, el tratamiento alcalino solubilizó solo una parte del material inicial. En todos los casos, tras la disolución y centrifugación sedimentó una cantidad variable de un residuo insoluble fuertemente pigmentado de un tono pardo oscuro, cuya composición desconocemos, y que fue desechado. El material soluble en álcali se filtró a través de

columnas preparativas con Sepharose CL6B, monitorizando el contenido en carbohidratos de las fracciones para representar los perfiles de elución (Figura 81a). Los resultados que se muestran a continuación reflejan como la presencia de otras sustancias no glucídicas presente en los extractos dificultó la purificación y análisis del componente glucídico. Los rendimientos de recuperación de material tras la filtración en gel, calculados en base al peso seco de cada fracción tras su diálisis y liofilización, fueron muy bajos. Probablemente la disolución de las muestras en NaOH y su elución en este solvente conlleva la ruptura de enlaces y la degradación de algunos componentes de las muestras (como proteínas y ésteres) y por tanto a la pérdida de compuestos de baja masa molecular derivados de la muestra inicial, tales como aminoácidos, glicerol y ácidos grasos.

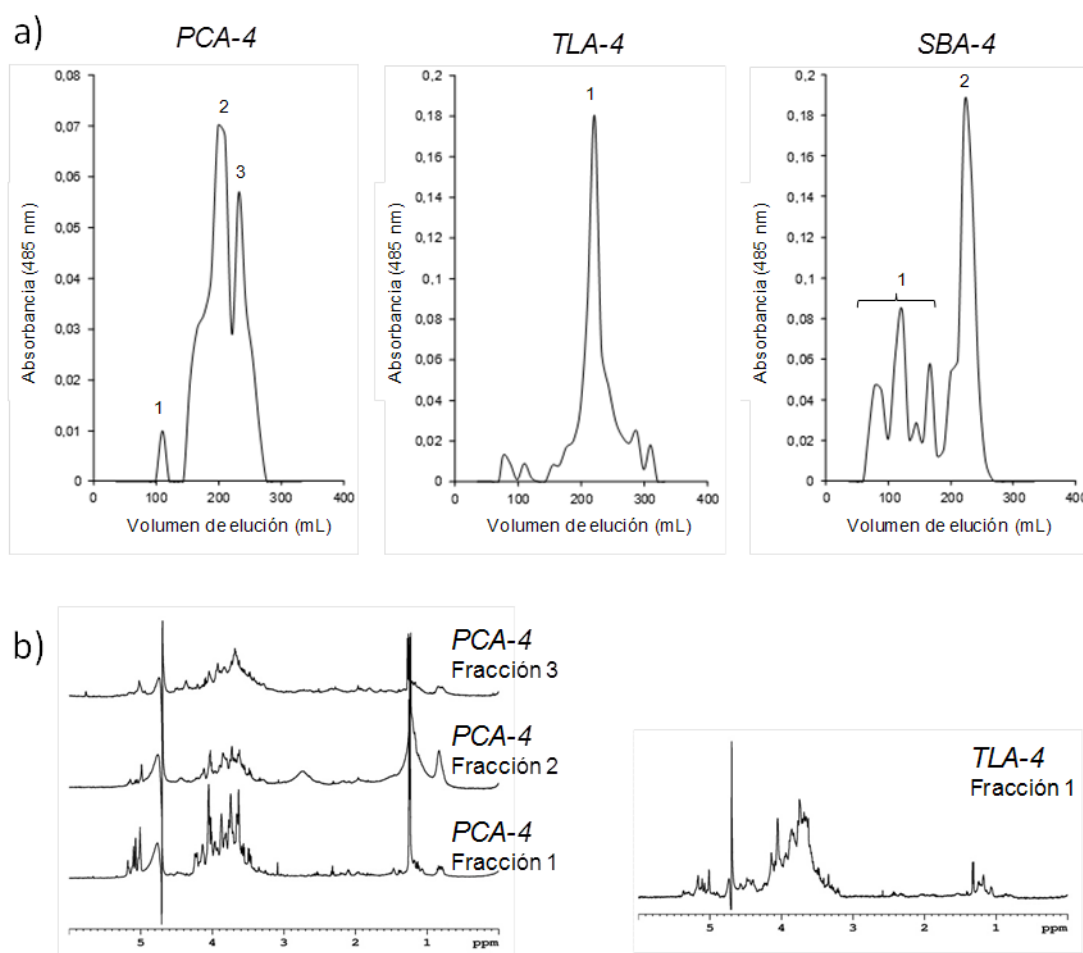


Figura 81. Análisis de las fracciones neutras precipitadas con Cetavlon. a) Filtración en gel de Sepharose CL6B de PCA-4, TLA-4 y SBA-4. b) Región anomérica de los espectros ^1H -RMN de las fracciones de PCA-4 y TLA-4.

La composición de las fracciones mayoritarias obtenidas a partir de los tres extractos fue analizada, tras hidrólisis ácida, mediante CG-EM. Todas ellas contienen

proporciones variables de arabinosa, ramnosa, manosa, galactosa, glucosa y ácido galacturónico.

Análisis de PCA-4. Las fracciones recogidas en el análisis de PCA-4 se reunieron en tres picos (Figura 81a). El primero de ellos (1) constituyó una pequeña cantidad del material inicial (< 1 %). El pico mayoritario (2) representó el 32,5% del material de partida y su masa molecular promedio, calculada a partir de este análisis, fue 64 kDa. El pico 3 representó el 28% del total, y su masa molecular promedio fue 19 kDa.

Los espectros de ^1H -RMN de las fracciones eluidas se muestran en la Figura 81b. El perfil de señales en los espectros de los picos 1 y 2 es muy similar tanto en la región anomérica (6-4,5 ppm) como en la región de los protones del anillo (4,5-3 ppm), aunque las señales son más intensas en el primero y el aspecto general del espectro es más limpio, lo que indica que tiene mayor contenido en carbohidratos y menos contaminantes no glucídicos. Probablemente, las fracciones separadas en este análisis contienen los mismos tipos de monosacáridos, aunque en diferentes proporciones y asociados a otros componentes, glucídicos o no. Entre las señales identificables en el espectro de protón, destacan algunas atribuibles a residuos de arabinofuranosa unidos mediante diferentes tipos de enlace, aunque también se detecta ramnosa, glucosa y manosa. Por último, la intensidad de las señales de carbohidratos en el espectro del pico 3 fue muy baja, lo que demuestra la escasez de material glucídico en esta fracción. Se valoró la actividad anti-VIH de los picos 2 y 3 y se comprobó que la fracción de 64 kDa tenía actividad antiviral (IC 50: 65,92 μM) mientras que la de 19 kDa no. Este hecho se puede correlacionar con el escaso contenido en carbohidratos de ésta y/o con la presencia de componentes no glucídicos que puedan afectar negativamente la actividad biológica. También existen estudios que relacionan la actividad antiviral de los polisacáridos con el peso molecular de los mismos (Dong *et al.*, 2012). La actividad biológica del pico 1 no pudo valorarse por no disponer de material suficiente para los ensayos.

Análisis de TLA-4. La filtración en gel de la muestra TLA-4 rindió una sola fracción polisacáridica de masa molecular promedio 30 kDa, que representó el 40,3% de la muestra inicial. Su espectro de protón (Fig. 81b) presentó señales similares a las detectadas en las fracciones de PCA-4, atribuibles a arabinosa, ramnosa, galactosa y manosa junto a otras adicionales. El material purificado también presentó actividad frente a VIH (IC50: 51,92 μM).

Análisis de SBA-4. Tras el análisis mediante SEC de SBA-4 solubilizada en NaOH se recogieron dos fracciones (Fig. 81a). La más homogénea de las dos tenía 30 kDa de masa molecular promedio y cada una de ellas representó tan sólo un 7% del material

de partida. Este bajísimo rendimiento demostró que la fracción SBA-4 contenía muy pocos carbohidratos, tal y como ya se había detectado inicialmente al valorar carbohidratos neutros totales. La escasa cantidad de muestra purificada no permitió continuar con su estudio. La fracción de 30 kDa no tenía actividad antiviral.

Los resultados de estos análisis pusieron de manifiesto la necesidad de variar la estrategia de purificación de los polisacáridos. Todas las fracciones separadas en los experimentos anteriores seguían conteniendo productos de la degradación de material proteico y lipídico contenido en la muestra inicial, que se iban arrastrando a lo largo de la columna, eluyendo conjuntamente con los carbohidratos. Como ya se ha comentado, el tratamiento alcalino produce la ruptura de enlaces (por ejemplo, ésteres) y la degradación de algunos componentes de las muestras, como proteínas. Dado que los carbohidratos son estables al álcali, nos planteamos evaluar el efecto del tratamiento con NaOH sobre los extractos neutros TLA-4, SBA-4 y PCA-4, seguido esta vez de precipitación de los polisacáridos con etanol y de diálisis para eliminar los productos generados por degradación alcalina de los componentes no glucídicos.

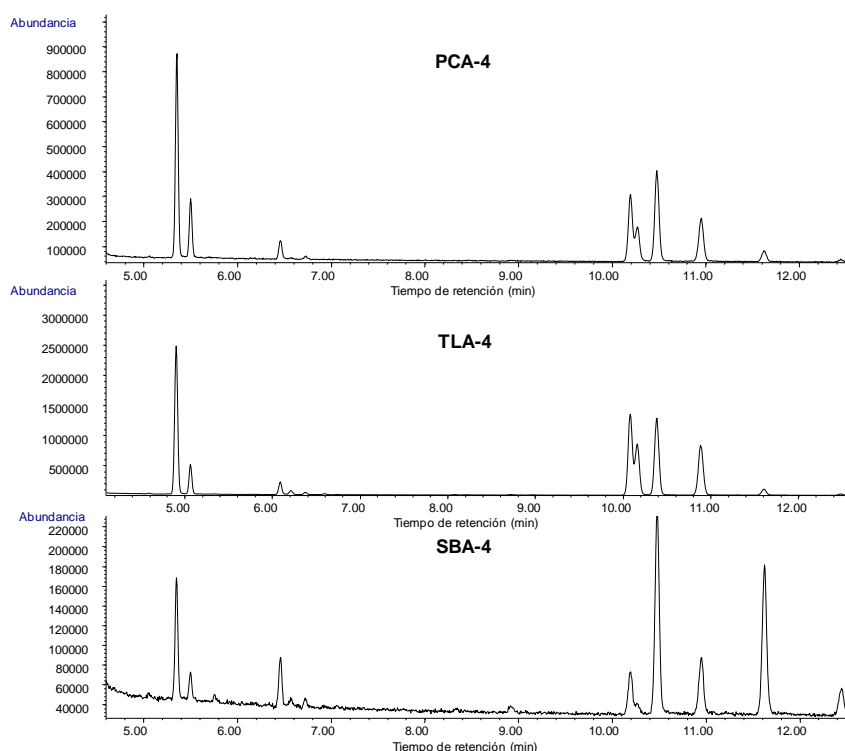


Figura 82. Cromatogramas (GC-EM) correspondientes al análisis de las fracciones neutras tras su tratamiento con NaOH, precipitación con etanol y diálisis. Se observa la eliminación de ácidos grasos y proteína.

La composición de los productos resultantes se analizó por cromatografía de gases (Figura 82) y RMN, comprobando que habían desaparecido tanto la proteína como los

ácidos grasos, mientras que los picos de carbohidratos se mantenían idénticos a los del ensayo anterior tanto cualitativa como cuantitativamente. Como ejemplo, en la figura 16 se compara el espectro de protón de PCA-4 nativa (Figura 83a), con el de dos muestras sometidas al tratamiento alcalino: el pico 1 resultante del fraccionamiento en Sepharose CL6B (Figura 83b) y la propia PCA-4 nativa (Figura 83c). Esta última muestra fue la que demostró tener mayor contenido glucídico, tal y como se deduce de la intensidad de las señales de la región anomérica del espectro (encuadrada en rojo).

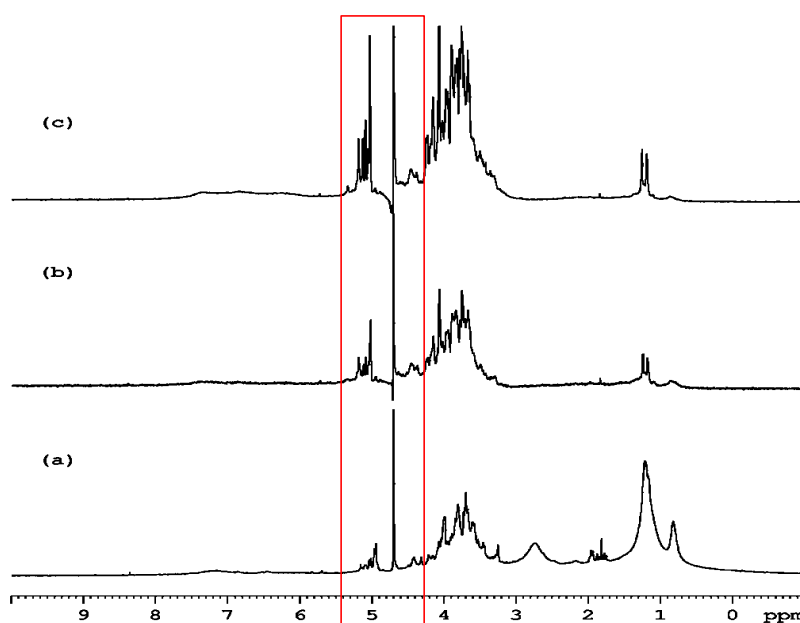


Figura 83. Comparación de los espectros de ^1H -RMN de a) la fracción PCA-4 nativa, b) el pico 1 obtenido en la purificación mediante SEC, tras el tratamiento alcalino y c) la fracción PCA-4 nativa tratada con álcali.

Esta aproximación demostró ser muy efectiva para la eliminación de una buena cantidad de compuestos no glucídicos, pero podía conllevar la pérdida de actividad biológica de los extractos. Por ello, se ensayó la actividad antiviral de los productos obtenidos tras tratamiento con NaOH, precipitación con etanol y diálisis, comprobando que se mantenía, lo que apuntaba directamente a los carbohidratos presentes en los extractos como responsables de la misma.

8.2.5. Tratamiento con NaOH y etanol para purificación de los extractos vegetales

Los análisis previos demostraban que el tratamiento de los extractos iniciales con Cetavlon no había permitido separar fracciones glucídicas con distinta composición,

sino que rindió mezclas complejísimas de biomoléculas vegetales imposibles de caracterizar. La pequeña porción glucídica de los extractos, aunque generalmente más concentrada en las fracciones “neutras”, aparecía repartida entre todas las obtenidas tras la precipitación con Cetavlon. Por ello, y para tratar de recuperar la mayor proporción posible de los carbohidratos contenidos en las muestras, se decidió retornar a los extractos originales de las plantas, SBA, PCA y TLA y, en primer lugar, degradar con álcali proteínas y ácidos grasos. En la diálisis posterior no solo se sustituye el NaOH de la mezcla por agua, sino que además se eliminan los productos de degradación no deseados, quedando las muestras enriquecidas en carbohidratos. En el interior de las membranas se observó la presencia de sustancias insolubles en agua, que fueron separadas del material soluble mediante centrifugación y procesadas independientemente. Por tanto, como resultado de este tratamiento se obtuvieron dos fracciones a partir de cada extracto vegetal: una soluble en agua (PCAs, SBAs y TLAs) y otra insoluble (PCAi, SBAi y TLAi). Hemos de destacar que la proporción de la fracción soluble fue en todos los casos de 4 a 5 veces superior que la fracción insoluble.

Muestra	Azúcares neutros	Ácidos urónicos
	(%)	(%)
PCA sol	66,4	7,3
TLA sol	73,1	2,1
SBA sol	67,9	4,5
PCA insol	41,1	16,4
TLA insol	23,7	2,8
SBA insol	36,6	8,5

Tabla 7. Valoración de carbohidratos neutros y ácidos en las fracciones solubles e insolubles en álcali de los extractos vegetales.

La valoración de carbohidratos neutros totales (Tabla 7) demostró que el material obtenido tras este fraccionamiento estaba muy enriquecido en carbohidrato, y que las fracciones solubles contenían una cantidad de azúcares neutros notablemente mayor que las fracciones insolubles.

La determinación de ácidos urónicos (Tabla 7) mediante el método del carbazol indicó que las fracciones insolubles contienen mayor cantidad de ácidos urónicos y, en concreto, la fracción insoluble en álcali de PCA presentó una proporción notablemente mayor que el resto.

8.2.6. Composición monosacáridica de las fracciones soluble e insoluble

Para analizar su composición, las fracciones solubles e insolubles fueron despolimerizadas mediante hidrólisis ácida y posteriormente analizadas por CG-EM. Se prepararon dos tipos de derivados cromatográficos diferentes, que aportan información complementaria acerca de la composición de las muestras. Los monosacáridos neutros y los aminoazúcares, si los hubiera, se detectan como picos únicos al convertirlos en sus correspondientes acetatos de alditol, lo que permite identificarlos y cuantificarlos con facilidad. Sin embargo, el empleo de estos derivados no permite detectar ácidos urónicos ni componentes no glucídicos. Para ello, es preciso utilizar otro tipo de derivados, en nuestro caso las TMS-oximas de los productos liberados en la hidrólisis ácida del material.

Muestra	Ram	Ara	Xil	Man	Glu	Gal	Ác. Gal
PCA sol	5,4	42,6	2,6	4,4	32,8	12,2	tr.
TLA sol	4,2	53,4	3,4	6,3	23,6	9,1	tr.
SBA sol	14,3	23,6	2,8	1,2	36,7	19,5	tr.
PCA ins	9,3	34,0	9,3	0,7	14,7	10,0	22,0
TLA ins	2,3	27,9	0,0	4,7	32,6	9,3	23,3
SBA ins	17,0	18,0	11,0	1,0	22,0	14,0	17,0

Tabla 8. Proporciones relativas (%) de monosacáridos en las fracciones soluble e insoluble en álcali de los extractos vegetales, calculadas a partir de los datos cromatográficos del análisis de acetatos de alditol y TMS-oximas. Los valores son promedios de tres experimentos.

Todas las fracciones analizadas contienen arabinosa, ramnosa, manosa, galactosa y glucosa (Tabla 8), pero sus proporciones varían entre especies y en las fracciones soluble e insoluble de una misma especie vegetal. El material insoluble contiene mayor proporción de ácido galacturónico, lo que concuerda con la valoración colorimétrica de ácidos urónicos, siendo este el componente más característico de las pectinas vegetales. Los polímeros de ácidos urónicos son sumamente resistentes a su rotura mediante hidrólisis ácida, y por ello los rendimientos en la hidrólisis de estas fracciones fueron muy bajos.

8.2.6.1. Espectroscopía de infrarrojos (FTIR).

Los espectros de infrarrojos pueden dar información acerca de la configuración α o β de los enlaces glicosídicos, así como de la presencia de sustituyentes de tipo N-acetilo, carboxilo, fosfato o sulfato.

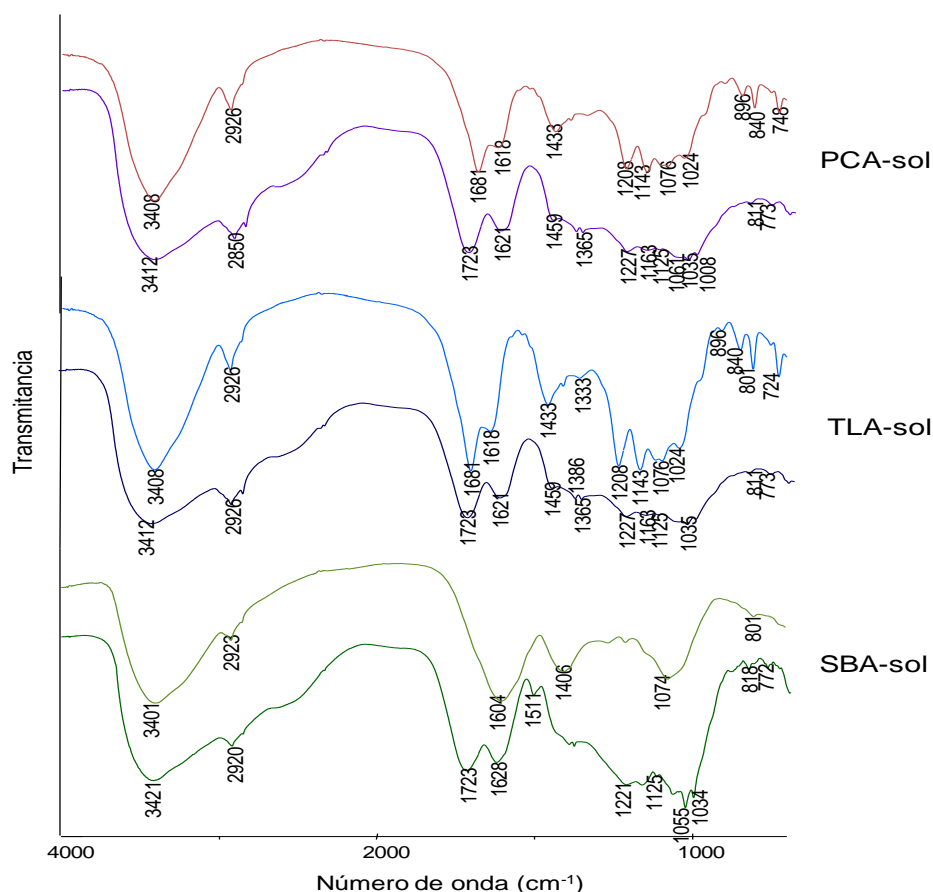


Figura 84. Espectros de IR de las fracciones solubles antes (superior) y después (inferior) de ser acidificadas con HCl. En los espectros correspondientes a los polisacáridos con grupos carboxílicos no disociados se observa la desaparición de la banda a 1620 cm^{-1} y la aparición de una banda intensa alrededor de 1725 cm^{-1} .

En todos los espectros registrados, sean de fracciones insolubles o solubles, se observa un perfil de carbohidratos, caracterizado por una banda amplia originada por vibraciones de tensión de los grupos -OH de los alcoholes ($3600\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$) y por otras localizadas en la zona de la “huella dactilar”, entre 1430 y 800 cm^{-1} , debidas a vibraciones de los anillos de los monosacáridos (piranosas o furanosas), a las vibraciones de flexión de grupos -OH . Por otra parte, la observación de la región del carbonilo ($1820\text{-}1660\text{ cm}^{-1}$) y de sus bandas asociadas nos da información sobre la presencia de ácidos o sus sales, ésteres, aldehídos o cetonas.

En un primer análisis de las fracciones solubles de las tres especies vegetales (Figura 84) observamos, además del patrón general atribuible al espectro de FTIR de polisacáridos, una banda en la región del carbonilo a alrededor de 1680 cm^{-1} . Esta señal puede ser atribuida a la presencia de sales de ácidos carboxílicos, posiblemente sales sódicas de los ácidos urónicos producidas por el tratamiento alcalino. Para confirmarlo, se acidificaron las muestras con unas gotas de HCl, dializando y liofilizando a continuación. Como se observa en la Figura 84, los espectros de FTIR de

las muestras acidificadas muestran el desplazamiento de dicha banda hasta aproximadamente 1725 cm^{-1} , absorción característica de ácidos carboxílicos no disociados.

Los espectros de las fracciones insolubles de las tres especies vegetales son muy similares entre sí y muestran las bandas de absorción características de los polisacáridos pécticos. En la Figura 85, se incluye, en primer término, el espectro de pectina comercial y a continuación, los de las fracciones aisladas de los extractos vegetales tras su acidificación con HCl, paso necesario para poner de manifiesto la banda de absorción característica de ácidos carboxílicos ($1720\text{-}1750\text{ cm}^{-1}$). Las bandas a aproximadamente 1100 y 1017 cm^{-1} son también características de homopoligalacturonanos (Robert *et al.*, 2005). En cuanto a la configuración anómérica de los enlaces glicosídicos, las bandas a 830 y 950 cm^{-1} , presentes en todos los espectros, revelan la presencia de anómeros α , aunque también se detecta una banda poco intensa, característica de anómeros β , a 890 cm^{-1} . Esto indica la coexistencia de ambos tipos de anómeros en los polímeros analizados.

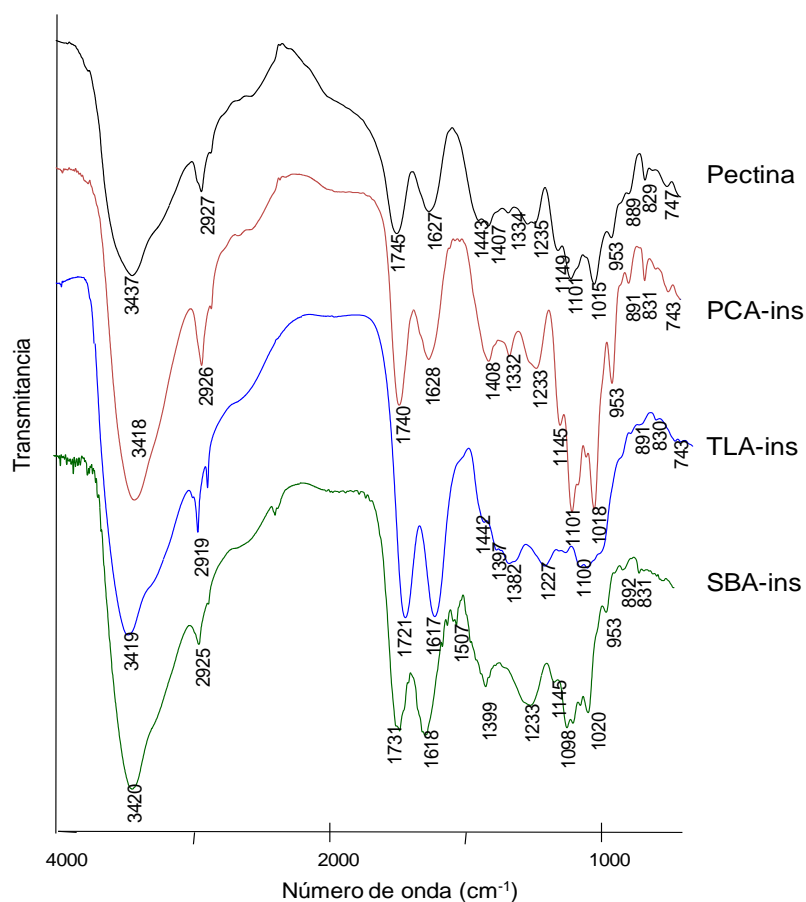


Figura 85. Espectros de IR de pectina comercial y de las fracciones insolubles en agua. Previamente al análisis, las muestras fueron acidificadas con HCl para poder observar la banda de ácidos carboxílicos no disociados.

8.2.6.2. Análisis de metilación de las fracciones solubles

Los tipos de enlace de los polisacáridos contenidos en las fracciones solubles se investigaron mediante análisis de metilación. Puesto que alguna de las fracciones contenía pequeñas cantidades de ácido galacturónico, en una primera etapa se obtuvieron los derivados permetilados de los polisacáridos y a continuación se redujeron los grupos ácidos con NaBD₄ en etanol al 75% (Hollisworth *et al*, 1984). Los residuos de ácido galacturónico son transformados en galactosa, que se hidroliza y detecta sin dificultad. Además, al llevar a cabo la reducción con un reactivo deuterado introducimos 2 Da adicionales en el C que soportaba el carboxilo en la molécula original (C6) de modo que mediante el espectro de masas podemos identificar fácilmente las unidades de galactosa derivadas de esta reacción. Finalmente, el polisacárido metilado y con los carboxilos reducidos es hidrolizado con ácido, liberando los correspondientes acetatos de alditol parcialmente metilados, que son analizados mediante GC/MS. En este caso, y conocida por los experimentos previos, la presencia de cantidades abundantes de arabinofuranosa en el material a analizar, se abordó la hidrólisis y derivatización de los polisacáridos permetilados en dos etapas. En un primer paso se hidrolizó el material con ácido trifluoroacético muy diluido (TFA 0,15 M), tratando de conseguir en la medida de lo posible la liberación de los extremadamente lábiles residuos de arabinofuranosa. Los azúcares liberados con este tratamiento suave se derivatizaron totalmente para evitar su destrucción con la segunda hidrólisis ácida (TFA 3 M), efectuada inmediatamente después. Los tipos de enlace presentes en las muestras analizadas se dedujeron a partir de la interpretación de los espectros de masas de cada pico cromatográfico, teniendo en cuenta el tiempo de retención de los compuestos.

Los resultados obtenidos para las tres fracciones solubles se presentan en la Tabla 9, que refleja que la complejidad de estas muestras sigue siendo extremadamente alta, con hasta 20 tipos de residuos monosacáridicos diferentes. En las tres muestras analizadas se detectaron residuos monosacáridicos correspondientes a unidades lineales de la cadena, a puntos de ramificación, y a unidades terminales, o extremos de la misma. Estos datos reflejan la existencia de polisacáridos ramificados en las muestras analizadas. Por otra parte, la mayoría de los tipos de unidades identificados en las tres muestras son los mismos, aunque existen cambios sustanciales en sus proporciones. La elevada sensibilidad de esta técnica permitió también detectar e identificar pequeñas cantidades (1-2%) de otros monosacáridos, entre los cuales podemos destacar el ácido galacturónico unido mediante enlaces (1→4). A

continuación se analizarán individualmente los resultados obtenidos en la fracción soluble de cada especie.

Fracción PCA soluble. Las unidades predominantes (24%) son de arabinofuranosa (Araf) ensamblada mediante enlaces (1→5), aunque este no es el único tipo de enlace mediante el cual se asocia la Araf en la muestra analizada. Se identificaron también residuos terminales (Araf-(1→)) y enlazados en (1→3) (1→3,5) y (1→2,5). Otros componentes relevantes desde el punto de vista cualitativo, son la galactopiranososa, unida mediante diferentes tipos de enlace pero que aparece principalmente como unidades ramificadas (1→3,6), y la glucopiranososa que, por el contrario, ocupa principalmente posiciones terminales (13,8% de Glcp-(1→)). La elevada sensibilidad de esta técnica permitió también detectar e identificar pequeñas cantidades de otros monosacáridos como manosa.

Tipo de enlace	Tr (min)	iones característicos (m/z)	PCA sol	TLA sol	SBA sol
Araf-(1→	4,0	87, 101, 118, 129, 161	7,0	6,2	4,7
→3)-Araf-(1→	5,2	118, 173, 233	2,6	4,3	6,5
→5)-Araf-(1→	5,7	87, 88, 102, 118, 129, 130, 162, 173, 189	24,0	30,2	7,9
→3,5)-Araf-(1→	7,2	85, 118, 127, 159, 201, 261	7,6	11,3	3,8
→2,5)-Araf-(1→	7,5	87, 88, 129, 130, 190	5,6	11,2	4,4
TOTAL ARABINOSA			46,7	63,3	27,3
Galp-(1→	7,0	88, 101, 102, 118, 129, 130, 205, 206	2,2	2,0	2,6
→4)-Galp-(1→	8,5	88, 102, 113, 118, 130, 162, 173, 233	4,3	4,9	4,5
→3)-Galp-(1→	8,9	87, 101, 118, 129, 161, 174, 234, 277	3,4	2,9	4,0
→6)-Galp-(1→	9,9	88, 102, 118, 129, 130, 162, 189, 233	3,2	1,1	8,5
→3,4)-Galp-(1→	10,3	87, 118, 129, 305	0,0	2,8	3,3
→3,6)-Galp-(1→	12,5	87, 118, 129, 174, 189, 234, 305	10,6	4,9	14,4
TOTAL GALACTOSA			23,7	18,7	37,3
Glcp-(1→	6,5	88, 101, 102, 118, 129, 130, 205, 206	13,8	1,4	3,6
→4)-Glcp-(1→	8,7	88, 102, 113, 118, 130, 162, 173, 233	5,0	4,6	19,3
→4,6)-Glcp-(1→	11,3	87, 102, 118, 127, 129, 201, 261	4,0	1,5	4,5
TOTAL GLUCOSA			22,7	7,5	27,4
→4)-GalAcp-(1→	11,5	87, 102, 118, 127, 129, 203, 263	3,8	3,0	3,6
TOTAL ÁCIDO GALACTURÓNICO			3,8	3,0	3,6
→4)-GlcAcp-(1→	11,3	87, 102, 118, 127, 129, 203, 263	0,0	1,0	0,0
TOTAL ÁCIDO GLUCURÓNICO			1,0	1,0	0,0

4)-Ramp-(1	4,3	88, 101, 102, 131, 162	1,0	1,2	1,9
TOTAL RAMNOSA			1,0	1,2	1,9
)-Xilp-(1	5,8	87, 118, 129, 189, 162, 241	0,0	3,9	0,0
TOTAL XILOSA			0,0	3,9	0,0
2)-Manp-(1	8,3	87, 88, 101, 129, 130, 161, 190, 205	3,4	0,0	1,0
4,6)-Manp-(1	8,3	102, 118, 162, 201, 261	1,7	3,6	0,9
TOTAL MANOSA			5,1	3,6	1,9

Tabla 9. Tipos de enlace deducidos del análisis de metilación y porcentajes relativos de los mismos en cada una de las muestras solubles. En cada una de las muestras se ha señalado en negrita el componente mayoritario.

Fracción TLA soluble. Los resultados de su análisis de metilación son muy similares a los de la muestra anterior, siendo la diferencia más destacable que el contenido en Glcp-(1→ es mucho menor (solo 1,4%). La arabinofuranosa es el componente mayoritario (63,3%) y está unida principalmente (30.2%) por enlaces (1→5). Las unidades predominantes son de arabinofuranosa (Araf) ensamblada mediante enlaces (1→5), aunque este no es el único tipo de enlace mediante el cual se asocia la Araf en la muestra analizada. Se identificaron también residuos terminales (Araf-(1→) y enlazados en (1→3) (1→3,5) y (1→2,5). Otros componentes relevantes desde el punto de vista cualitativo, son la galactopiranososa, unida mediante diferentes tipos de enlace pero que aparece principalmente como unidades ramificadas (1→3,6), y la glucopiranososa que, por el contrario, ocupa principalmente posiciones terminales (Glcp-(1→). También se identificaron pequeñas cantidades de otros monosacáridos como manosa y ácido galacturónico.

Fracción SBA soluble. Como ya indicaban todos los análisis previos el material glucídico contenido en esta fracción presenta mayores diferencias, no en cuanto a la identidad de los compuestos que lo conforman, sino en cuanto a sus proporciones relativas. Lo más destacado es que su principal componente es la galactosa, principalmente como unidades ramificadas (1→3,6) y lineales (1→6), pero también, y como componente individual más abundante, hay que mencionar su elevado contenido en (1→4)-Glcp. Este material presentó el menor contenido en arabinofuranosa (27,3%) de las tres muestras analizadas.

Las muestras TLAs y PCAs resultaron ser las mas activas en el ensayo de Inhibición de la infección en *trans* mediada por células Raji DC-SIGN, presentando un 50% y un 49% de inhibición, con un IC50 de 78,7 µg/mL y 73µg/mL respectivamente. Datos mas detallados en el capítulo de actividad antiviral.

En el ensayo de neutralización, que también describimos mas detalladamente en el apartado de actividad antiviral, todas las muestras resultaron activas, cabe destacar los compuestos SBAs, SBAi, PCAi, y PCAs que presentan un IC₅₀ de 1,8µg/mL, 24µg/mL, 2,4 µg/mL y 2,71µg/mL respectivamente.

8.2.6.3. Cromatografía de exclusión molecular de las fracciones solubles. Composición química del material purificado

Las fracciones solubles en agua obtenidas a partir de los tres extractos vegetales fueron analizadas mediante SEC utilizando agua como eluyente, valorando colorimétricamente la presencia de carbohidratos en las fracciones eluidas mediante una reacción del fenol-sulfúrico post-columna. Los perfiles de elución (figura 86) de los tres extractos muestran un pico mayoritario de elevada masa molecular (>10⁶ Da). Este valor está por encima del rango de separación de la columna empleada, por lo que no se puede afirmar si este pico contiene uno o varios componentes.

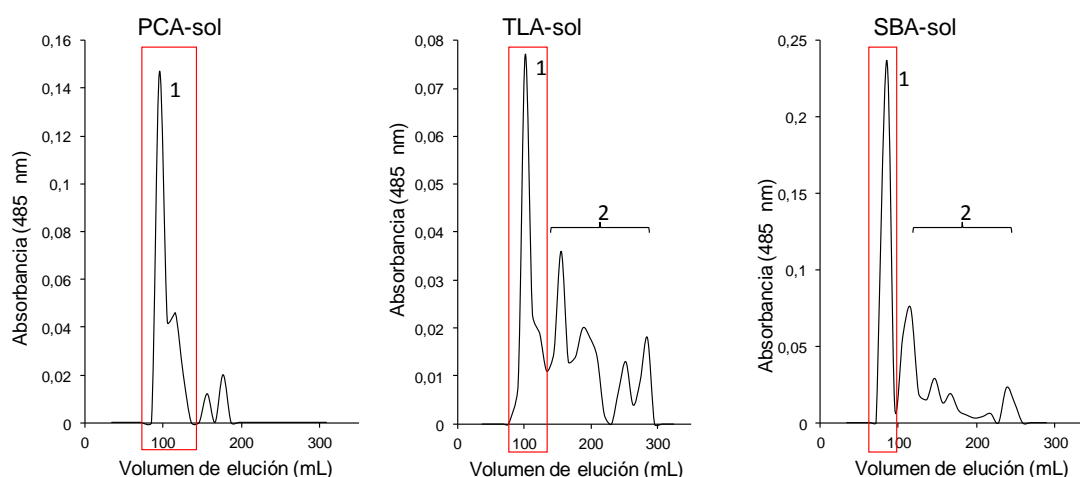


Figura 86. Cromatografía de exclusión molecular de las fracciones solubles en agua. Los picos encuadrados en rojo fueron analizados mediante RMN.

La Tabla 11 detalla las proporciones relativas de monosacáridos neutros de las fracciones separadas por SEC en Sepharose CL6B. En PCAs se recogió un único pico (PCAs-1), ya que apenas se detectaron carbohidratos en el resto de las fracciones eluidas de la columna. La composición de dicho pico es muy similar a la presentada en la Tabla 16 para la muestra no fraccionada. En las otras dos muestras, después de separar el componente mayoritario (pico 1), se reunió el resto del material eluido (pico 2) y se analizó exclusivamente su composición monosacáridica por no disponer de suficiente muestra para efectuar otros experimentos. En comparación con la muestra no fraccionada, TLAs-1 está enriquecida en ramnosa y galactosa mientras que TLAs-2 lo está en arabinosa. En el caso de SBAs-1, la mayor parte de la arabinosa y la

galactosa están en esta fracción, mientras que SBAs-2 está muy enriquecida en glucosa y ramnosa.

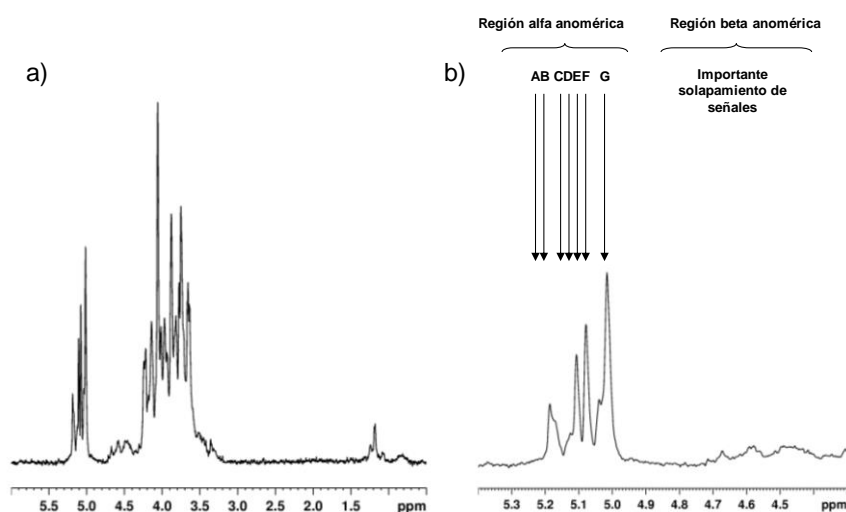
Muestra	Ram	Ara	Xil	Man	Glu	Gal
PCAs-1	3,8	45,1	0,0	0,0	30,2	20,9
TLAs-1	9,1	39,6	3,6	4,0	16,7	27,0
TLAs-2	0,0	80,3	0,0	2,7	11,8	5,2
SBAs-1	7,0	34,4	0,0	1,1	20,8	36,7
SBAs-2	17,6	6,8	0,0	0,0	56,3	19,3

Tabla 11. Proporciones relativas (%) de monosacáridos neutros en las fracciones separadas mediante SEC, calculadas a partir de los datos cromatográficos del análisis de acetatos de alditol. Los valores son promedios de dos experimentos.

En cuanto a la actividad biológica, las fracciones que muestran mayor actividad anti-VIH en el ensayo de neutralización a las concentraciones ensayadas, son PCAs1, TLAs1 y TLAs2, con un IC₅₀ de 0,38µg/mL, 5µg/mL y 6µg/mL. Las otras fracciones presentaron una actividad similar o menor a las predecesoras.

8.2.6.4. Estudio de las fracciones mayoritarias por RMN mono y bidimensional

Fracción PCA soluble. El espectro de ¹H-RMN del material recuperado en el pico mayoritario (Figura 87a) mostró el aspecto general de un polisacárido, sin señales atribuibles a otros componentes como proteínas o lípidos. En la región anomérica (Figura 87b) se observan desplazamientos químicos por encima de 5 ppm característicos de furanosas. Esto está de acuerdo con la elevada cantidad de arabinofuranosa detectada en este material.



Residuo	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
Integral (relativa)	2	1	2	3	4	2	7	-	-	-	-	-	-

Figura 87. Análisis de ^1H -RMN del material purificado mediante SEC a partir de PCA soluble. a) Espectro completo (3-6 ppm). b) Región anomérica por encima de 5 ppm, mostrando las señales de al menos siete residuos monosacáridicos diferentes (A-G). La tabla recoge las proporciones relativas de cada uno de los residuos, deducidas de la integración del área de cada señal.

En esta región del espectro se encontraron al menos siete sistemas de spin (marcados como A-G) en la muestra analizada. Esto significa que la muestra contiene al menos siete tipos de unidades monoméricas diferentes (monosacáridos diferentes o iguales unidos mediante diferentes tipos de enlace). Pero la complejidad de la muestra es aún mayor. Además de estas señales existen otras, en la región del espectro más cercana a la banda del agua deuterada (disolvente de la muestra), que eran difícilmente visibles en el espectro de protón por su baja intensidad. Para obtener información sobre los desplazamientos químicos de dichos componentes y tratar de establecer conectividades (tipos de enlace) entre los diferentes monómeros se recurrió a la realización de espectros bidimensionales.

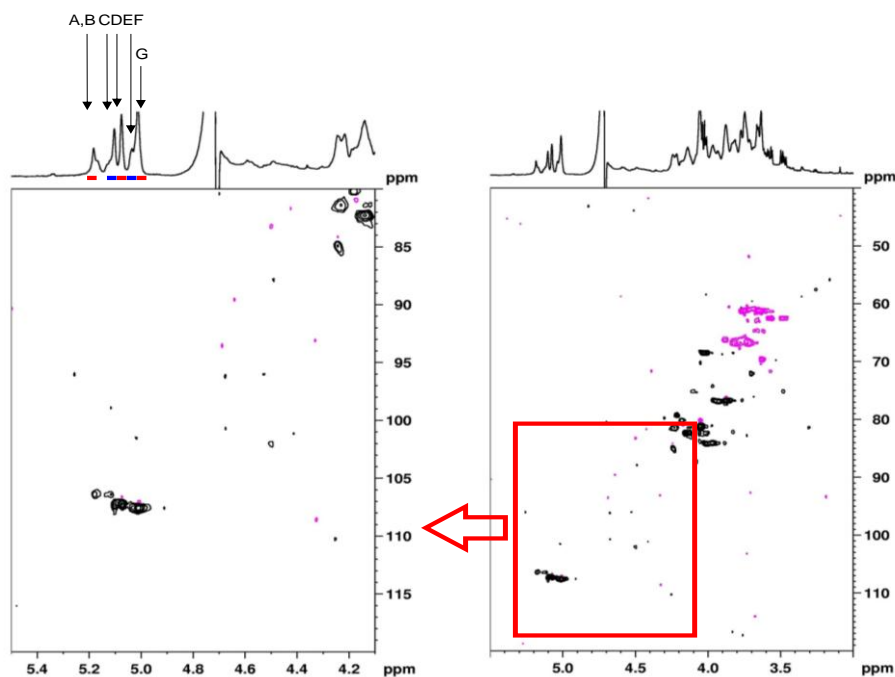


Figura 88. Análisis de 2D HSQC del material purificado a partir de PCA soluble.

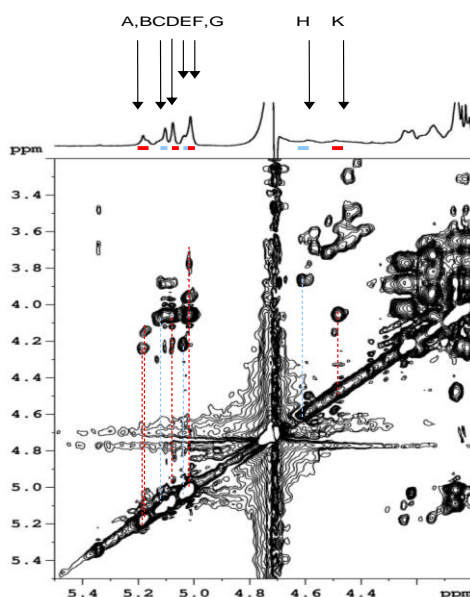


Figura 89. Análisis de 2D TOCSY del material purificado a partir de PCA soluble.

De los experimentos 2D TOCSY y 2D HSQC (Figuras 88 y 89) se dedujeron los desplazamientos químicos de $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ para los protones/carbonos anoméricos (Tabla 12). La mayoría de los sistemas de spin fue identificada mediante 2D TOCSY. Los resultados revelaron la presencia de al menos 13 tipos de unidades glucídicas diferentes en el material analizado, lo que sugiere la existencia de un polisacárido extremadamente complejo o de una mezcla de polímeros. Desgraciadamente, la complejidad del material analizado impidió la resolución de las señales carbonos en el experimento de HSQC y la asignación precisa de los carbonos excepto para las señales más intensas (A-G), que corresponden en todos los casos a unidades de arabinofuranosa. Estos resultados no permitieron establecer los tipos de enlace entre las unidades monoméricas en la muestra analizada.

Residuo	H1/ C1	H2/ C2	Hn/ Cn	Hn/ Cn	Hn/ Cn	Hn/ Cn	Asignación
A	5,182/ 106,369	4,241	4,016	3,880	3,768	3,649	α -Araf
B	5,171/ 106,298	4,142	3,941	3,819	3,733		α -Araf
C	5,125/ 106,412	4,075					α -Araf
D	5,104/ 107,236	4,052	3,887				α -Araf

E	5,075/ 107,179	4,057					α -Araf
F	5,036/ 107,449	4,218	4,039				α -Araf
G	5,019/ 107,549	4,057	3,963				α -Araf
H	4,605	3,864					β -Glc p
I	4,568	3,690	3,605				β -Gal p
J	4,514	3,708	3,543				β -Gal p
K	4,479	4,057					β -Glc p
L	4,472	3,672	3,592				β -Gal p
M	4,446	3,507	3,301				β -Gal p

Tabla 12. Desplazamientos químicos $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ de los protones/carbonos anoméricos deducidos de los experimentos 2D TOCSY and 2D HSQC del material purificado a partir de PCA soluble, demostrando la presencia de al menos 13 sistemas de spin diferentes.

Fracción TLA soluble. El espectro de ^1H -RMN del material recuperado en el pico mayoritario (Figura 90a) mostró también el aspecto general de un polisacárido libre de proteínas o lípidos. Los desplazamientos químicos por encima de 5 ppm en la región anomérica (Figura 90b) son característicos de furanosas y, como en el caso anterior, está de acuerdo con un alto contenido de arabinofuranosa.

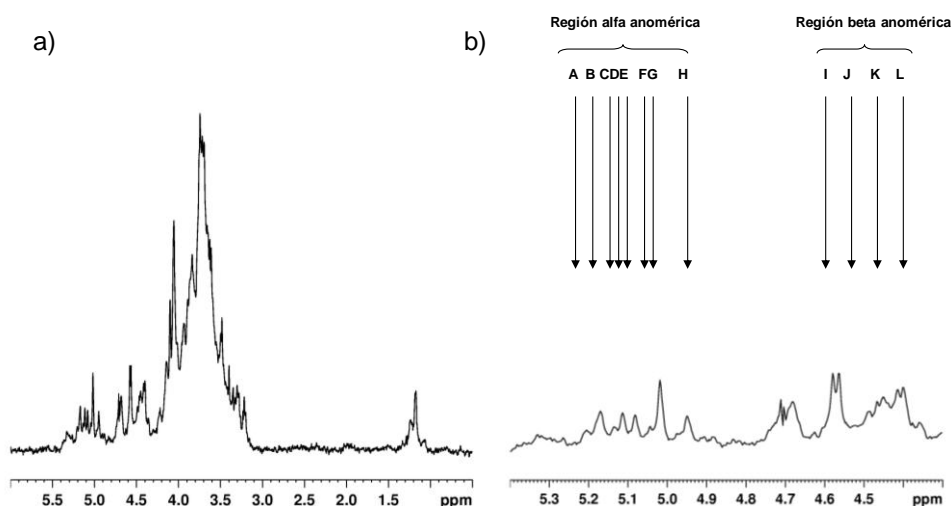


Figura 90. Análisis de ^1H -RMN del material purificado mediante SEC a partir de TLA soluble. a) Espectro completo (1-6 ppm). b) Región anomérica por encima de 4,2 ppm, mostrando las señales de al menos doce residuos monosacáridos diferentes (A-L).

En el espectro de protón se detectaron claramente doce sistemas de spin (marcados como A-L en la Figura 90b) correspondientes a al menos doce tipos de unidades monoméricas diferentes. Pero al igual que en el caso anterior, los experimentos 2D TOCSY y HSQC revelaron que en realidad existen dieciocho unidades diferentes en esta muestra.

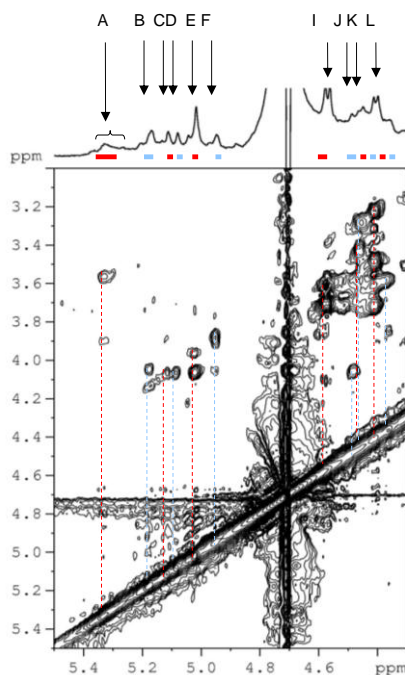


Figura 91. Análisis de 2D TOCSY del material purificado a partir de TLA soluble

Fracción SBA soluble. Al igual que en las muestras anteriores, el espectro de ^1H -RMN del material eluido en el pico mayoritario (Figura 92a) corresponde a lo esperado para un polisacárido rico en arabinofuranosa, aunque en este caso las señales registradas por debajo de 5 ppm son también muy intensas, reflejando mayor abundancia de otros componentes (Figura 92b). En el espectro de protón, la mayoría de las señales están muy solapadas, ensanchadas y poco definidas, lo que indica que el número de componentes de la muestra es superior a los once residuos diferentes detectados a primera vista.

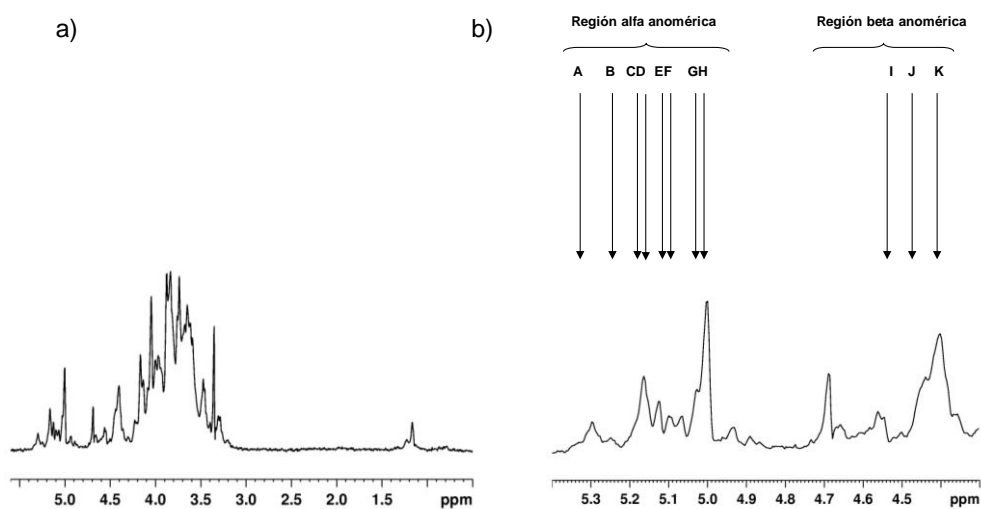


Figura 92. Análisis de ^1H -RMN del material purificado mediante SEC a partir de SBA soluble. a) Espectro completo (1-6 ppm). b) Región anomérica por encima de 4,2 ppm, mostrando las señales de al menos once residuos monosacáridos diferentes (A-L).

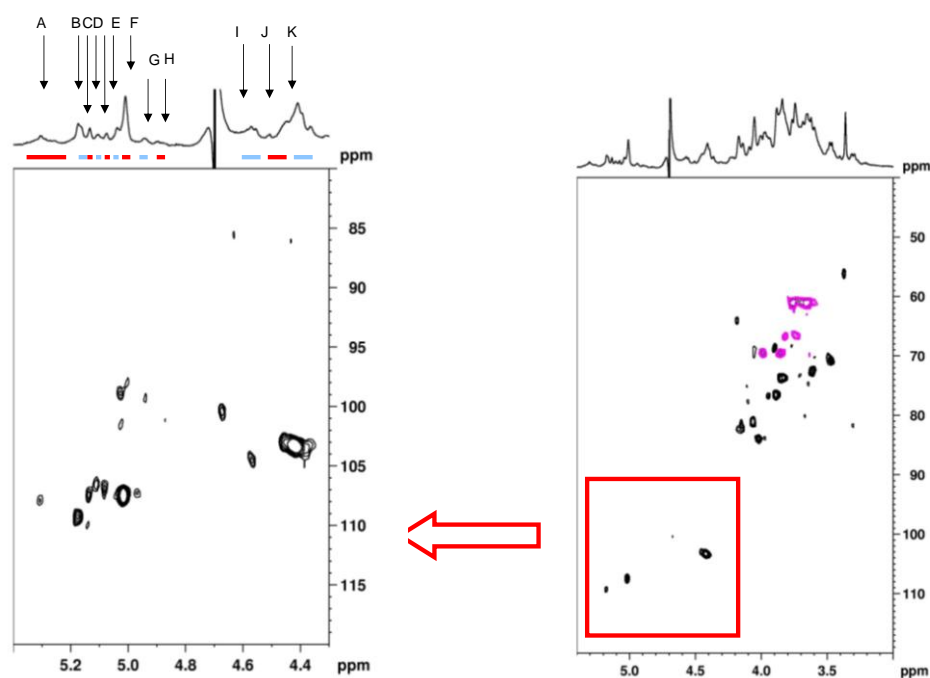


Figura 93. Análisis de 2D HSQC del material purificado a partir de SBA soluble.

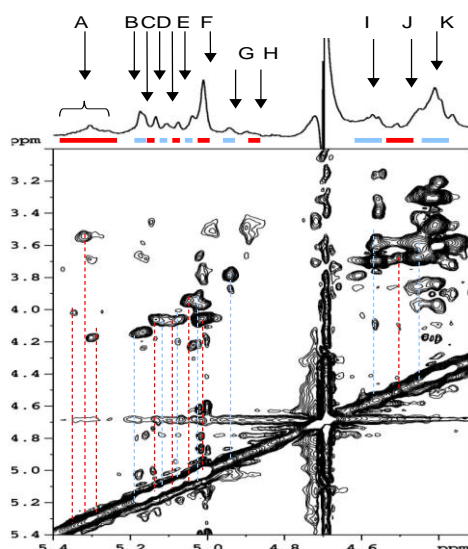


Figura 94. Análisis de 2D TOCSY del material purificado a partir de SBA soluble.

9. ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA DE LAS FRACCIONES PURIFICADAS

9.1 Ensayo de actividad antiviral y viabilidad celular

El ciclo biológico de VIH-1 consta de varias fases, una aproximación en el desarrollo de nuevos fármacos es ensayar como interfieren con la entrada viral, esta aproximación ofrece la capacidad de atacar un proceso que implica tanto a receptores celulares como a ligandos virales, pudiéndose llegar hipotéticamente a detener la infección y muerte de células no infectadas.

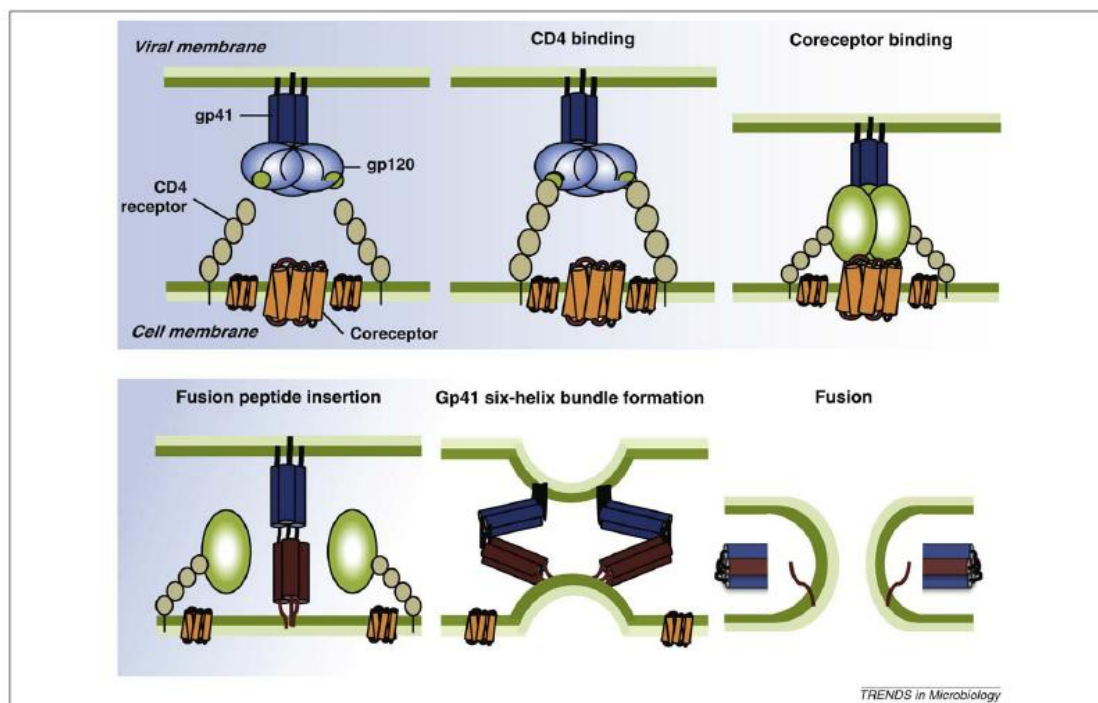


Figura 95. Etapas del proceso de fusión de VIH. Mecanismo de entrada de VIH -Unión CD4-gp120, unión de los correceptores (color naranja), gp120 sufre un cambio conformacional, CD4 induce epítomos que pueden unirse a receptores de quimoquina, a continuación gp41 es liberado en una conformación fusogénica y sus hélices N-terminal y C-terminal forman una estructura que conduce a la aproximación de membrana viral y celular que acaban fusionándose.

Para identificar en que etapa del ciclo replicativo del VIH actúan nuestros compuestos utilizamos ensayos de valoración de la actividad antiviral con virus recombinantes portadores del gen indicador luciferasa, la multiplicación viral se cuantifica midiendo la actividad luciferasa mediante luminometría. Dado que la actividad luciferasa es directamente proporcional al grado de infección, la disminución de dicha actividad refleja el efecto antiviral.

9.1.1. Ensayo de viabilidad celular en células RAJI DC-SIGN y en MT-2

Para el ensayo de viabilidad celular se empleó el kit CellTiter-Glo® Luminiscent cell viability assay (Promega) que mide la actividad mitocondrial. Se mide la actividad luciferasa, que cuantifica la cantidad de ATP (que esta directamente relacionada con la presencia de células metabólicamente activas). El resultado está representado en las gráficas junto con la actividad. Ninguno de los compuestos resultó ser tóxico para Raji DC-SIGN y para células MT-2, a las concentraciones ensayadas.

9.1.2. Efecto sobre la célula: Inhibición de la infección en *trans* mediada por células Raji DC-SIGN

Tratamos de averiguar si se produce interacción con la célula diana. Las células que vamos a utilizar Raji DC-SIGN, son células dendríticas que poseen el receptor de señal DC-SIGN, con afinidad por residuos manosa específicos. Previamente antes de poner en contacto el virus con las células, éstas se preincuban con los compuestos que vamos a analizar a distintas concentraciones. Para la infección utilizamos los virus NL4.3 Renilla (tropismo X4). Para evaluar el bloqueo de la transferencia de virus mediada por las células RAJI DC-SIGN, se mide la actividad luciferasa. Si se ha producido un bloqueo en la transferencia del virus es probable que se esté produciendo un efecto en el receptor de membrana celular DC-SIGN.

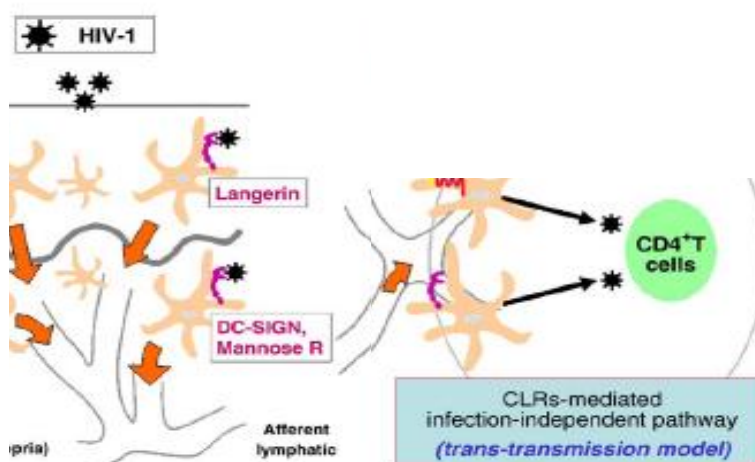


Figura 96. Mecanismo de Transinfección

Los resultados sugieren que los compuestos estudiados, presentan actividad a concentraciones a partir de 100µg/mL. Los que mayor actividad presentan son TLAs y PCAs, con un porcentaje de inhibición de 50% y de 49% respectivamente a la concentración de 100µg/mL y un IC₅₀ de 78,7µg/mL para TLAs y de 73µg/mL para PCAs. Se puede considerar que el compuesto SBAs no presenta actividad ya que su porcentaje de inhibición ronda el 39% a la mayor concentración (100µg/mL).

Parece que se está produciendo un bloqueo en la transferencia del virus, aunque no de una forma muy destacada, que podría estar relacionado con la densidad de monosacáridos de manosas que forman parte de estos.

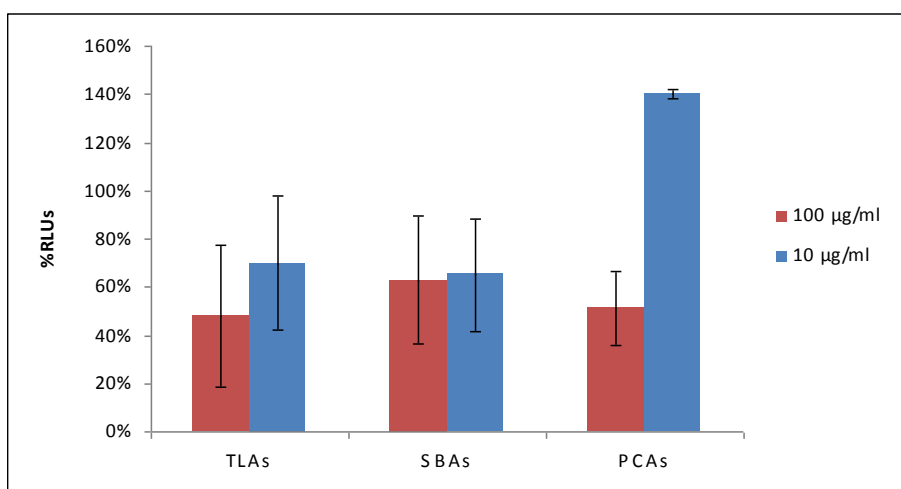


Figura 97. Valoración antiVIH por ensayo de transfección en células Raji DC-SIGN. Infección de células con el virus NL4.3 Renilla previamente incubadas con los compuestos a dos concentraciones 10 y 100µg/ml de los compuestos TLAs, SBAs y PCAs. Los resultados son expresados como porcentajes de infección.

También se valoraron las fracciones obtenidas tras columna SEC de los compuestos anteriores sin resultados concluyentes.

9.1.3. Efecto sobre el virus: Ensayo de neutralización

Para estudiar el posible efecto virucida, antes de que se produzca la interacción con la célula diana realizamos el ensayo de neutralización. Para la infección utilizamos los virus NL4.3 Renilla (tropismo X4) que se preincuba con cada compuesto 30min a 37°C, se diluye hasta la concentración de trabajo y se infectan células MT-2. Como controles se utilizan virus no tratados previamente con los compuestos y dosis del compuesto a las concentraciones finales existentes en la preparación del trabajo. Si la preincubación con el compuesto disminuye la actividad del virus es probable que se esté produciendo un efecto a nivel de la envuelta viral que disminuya la infectividad.

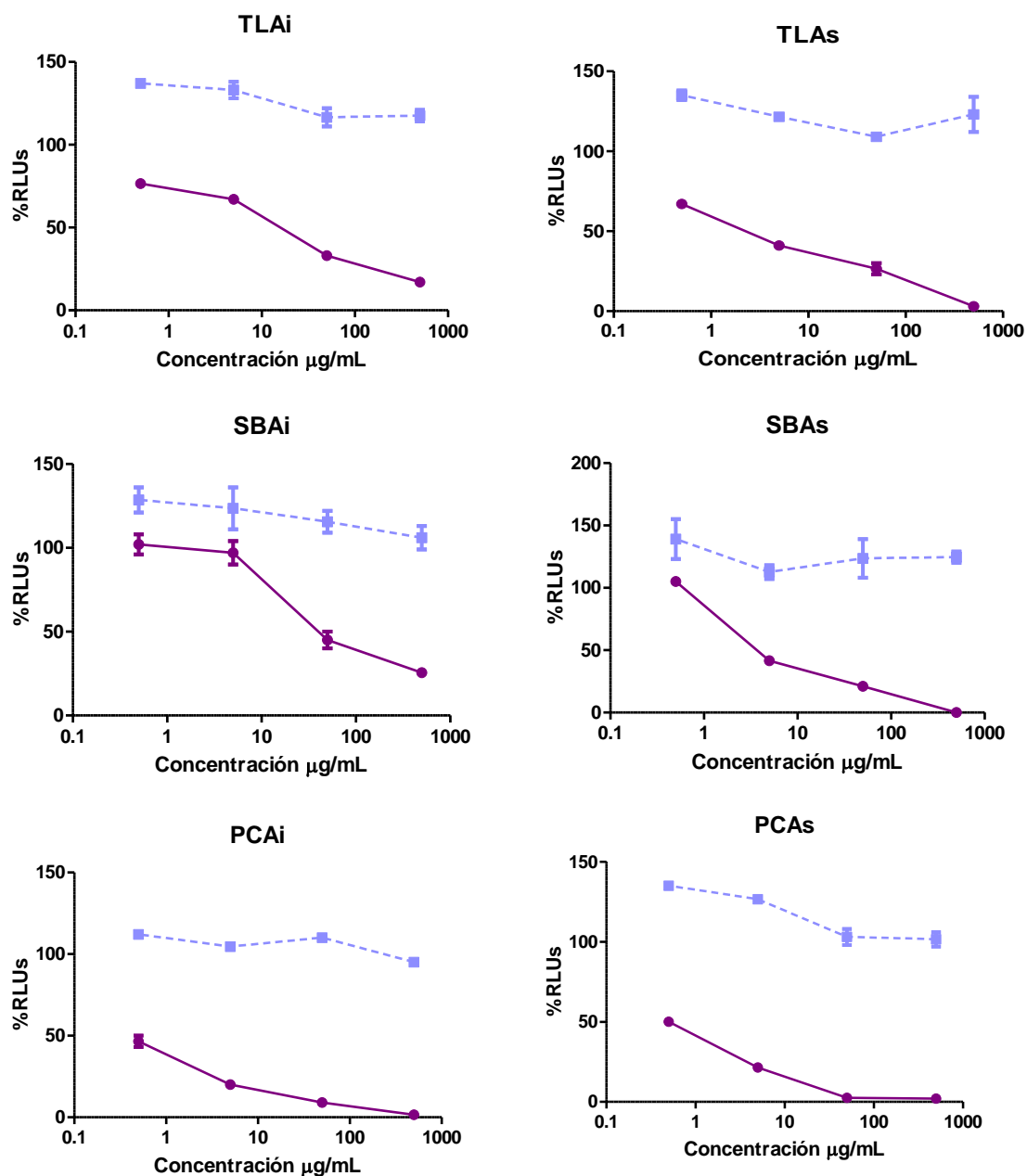


Figura 98. Valoración de la actividad antiviral por el ensayo de neutralización (morado) y control de la viabilidad(azul). Infección de células MT2 con el virus NL4.3 Luc en presencia de los compuestos. TLAI, TLAs, SBAi, SBAs, PCAi, PCAs. a distintas concentraciones que van de 0,5 a 500µg/mL.

	TLAI	TLAs	SBAi	SBAs	PCAi	PCAs
IC50 µg/mL	5,9	1,21	30,9	3,91	0,395	0,501
I.de confianza 95%	2,1-16,5	0,38-3,24	12-79	1,58-9,7	0,25-0,62	0,32-0,78
R²	0,8501	0,8120	0,9507	0,929	0,9215	0,9351

La actividad anti-VIH se produce en todos los compuestos ensayados como se puede observar en las gráficas, destacando los compuestos, PCAi, PCAs, TLAs y SBAs con un IC₅₀ de 0,39, 0,50, 1,21 y 3,91 µg/mL respectivamente, además no presentaron toxicidad en el intervalo de concentraciones ensayado.

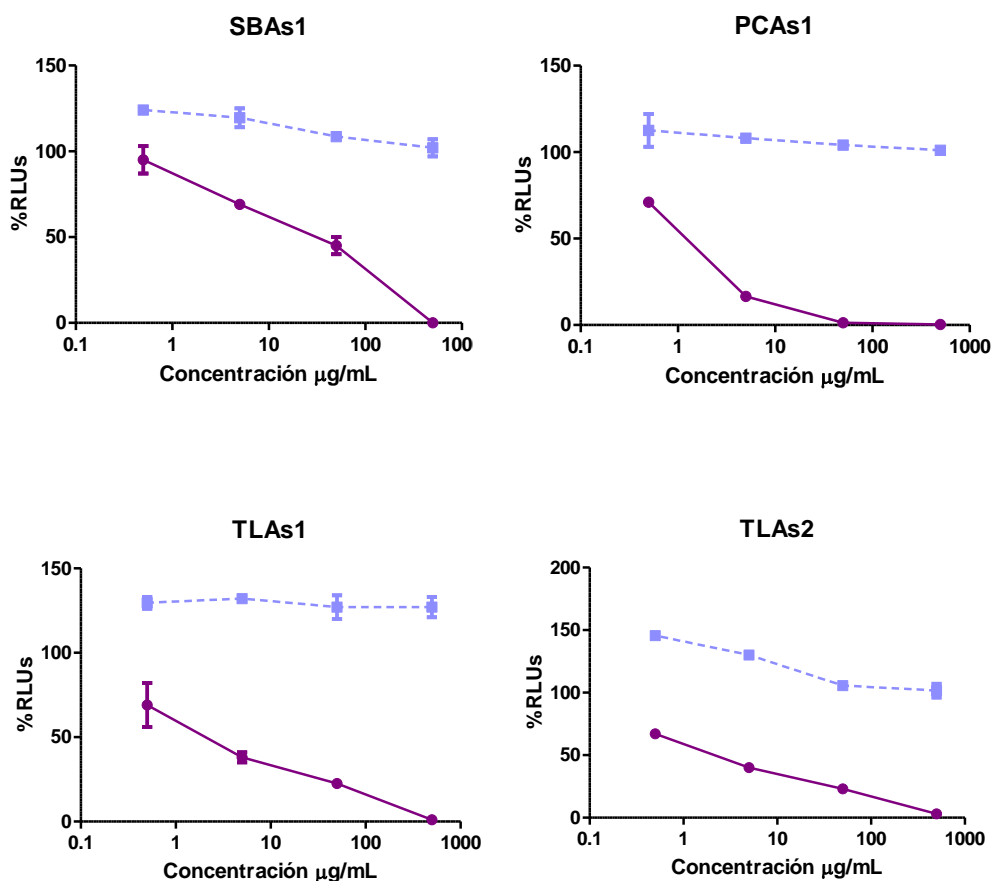


Figura 99. Valoración de la actividad antiviral por el ensayo de neutralización (morado) y control de la viabilidad (azul). Infección de células MT2 con el virus NL4.3 Luc en presencia de las fracciones extraídas en columna SBAs1, PCAs1, TLAs1 y TLAs2 a distintas concentraciones que van de 0,5 a 500 µg/mL

Todas las fracciones muestran actividad anti-VIH de forma dosis-dependiente en el ensayo de neutralización, sin mostrar citotoxicidad a las concentraciones ensayadas, siendo el mas activo PCAs 1.

	SBAs1	PCAs1	TLAs1	TLAs2
IC₅₀ µg/mL	28,01	1,17	1,31	1,16
I. de confianza 95%	9,3-83	0,8-1,9	0,4-4,0	0,46-2,94
R²	0,9075	0,9980	0,8172	0,8537

Las fracciones que muestran mayor actividad anti-VIH en el ensayo de neutralización después de su fraccionamiento y sin mostrar citotoxicidad a las concentraciones ensayadas, son PCAs1, TLAs1 y TLAs2. El resto de fracciones no figuran en la tabla pues presentan una actividad similar o menor a las fracciones predecesoras, como sucede con SBAs1, posiblemente debido a que en la purificación se pierden moléculas que favorecen la actividad.

9.2. Ensayo de actividad inflamatoria y citotoxicidad

Debido a que en estudios previos sobre polisacáridos se demuestra la actividad antiinflamatoria de los mismos, en el presente trabajo tratamos de estudiar dicha actividad utilizando modelos “*in vitro*”, y centrándonos en la cuantificación de mediadores de la inflamación.

Una vez que hemos obtenido los cultivos de macrófagos, los vamos a estimular con la producción de determinados mediadores de la inflamación y comprobar si los extractos a probar son capaces o no, de inhibir la liberación de eicosanoides por las células. Estos ensayos se realizan tanto en las fracciones obtenidas tras el tratamiento de Cetavlon, como las muestras purificadas.

Los mediadores escogidos para el estudio por su relevancia fisiológica son:

- Óxido nítrico (NO)
- Factor de necrosis tumoral α (TNF- α)

9.2.1 Ensayo de citotoxicidad

En el caso de las fracciones siguiendo el método de Cetavlon, se observa en general que a concentraciones superiores a 100 μ M son tóxicas, aunque destacan las fracciones neutras, es decir, SB4, PC4 y TL4, que resultan ser menos tóxicas a las concentraciones ensayadas que van desde 6,5 a 200 μ M. En la tabla señalamos la concentración a partir de la cual resultan ser tóxicas y por tanto se descartarán para el ensayo de actividad antiinflamatoria.

	SBA	PCA	TLA
2	>100 μ M	>100 μ M	>25 μ M
3	>100 μ M	>25 μ M	>12,5 μ M
4		>100 μ M	>100 μ M

Tabla 13. Concentración de muestra a partir de la cual resulta ser tóxica

En el caso de las fracciones purificadas con NaOH-etanol y diálisis, las fracciones que se van a ensayar que son las solubles resultan no ser ninguna tóxica a las concentraciones ensayadas que van desde 6,5 μ M a 100 μ M.

9.2.2. Ensayo de actividad anti-inflamatoria. Determinación de NO

Muestras Cetavlon: Los resultados sobre la producción de NO se recogen en la tabla 14 y en la Figura 100. Todas las fracciones inhiben significativamente la producción de NO en macrófagos intraperitoneales de ratón cepa ICR, estimulados con LPS, aunque con menor potencia que la sustancia de referencia, aminoguanidina. Las fracciones TL4 y PC4 son las que presentan mayor actividad, con un porcentaje de inhibición de 85% a concentraciones de 50 y 100 μ M respectivamente.

Muestra	NO μ M	% Inhibición
Control +	7,41 \pm 0,8	-
Control -	0,03 \pm 0,2	-
Aminoguanidina 100 μ M	0,46 \pm 0,3	95%
SBA2100 μ g/mL	1,63 \pm 0,05*	77%
SBA3 100 μ g/mL	1,26 \pm 0,6*	82%
SBA4 200 μ g/mL	1,23 \pm 0,1*	82%
PCA2 100 μ g/mL	2,10 \pm 0,9**	68%
PCA3 25 μ g/mL	1,01 \pm 0,1*	85%
PCA4 100 μ g/mL	1,00 \pm 0,1*	85%
TLA2 25 μ g/mL	1,42 \pm 0,01*	78%
TLA3 12,5 μ g/mL	1,45 \pm 0,1*	78%
TLA4 50 μ g/mL	0,97 \pm 0,1*	85%

Tabla 14. Actividad antiinflamatoria sobre la inhibición de NO, de las distintas fracciones tras tratamiento con Cetavlon. Test de la *t*-Student : * p <0.01 ; ** p <0.05

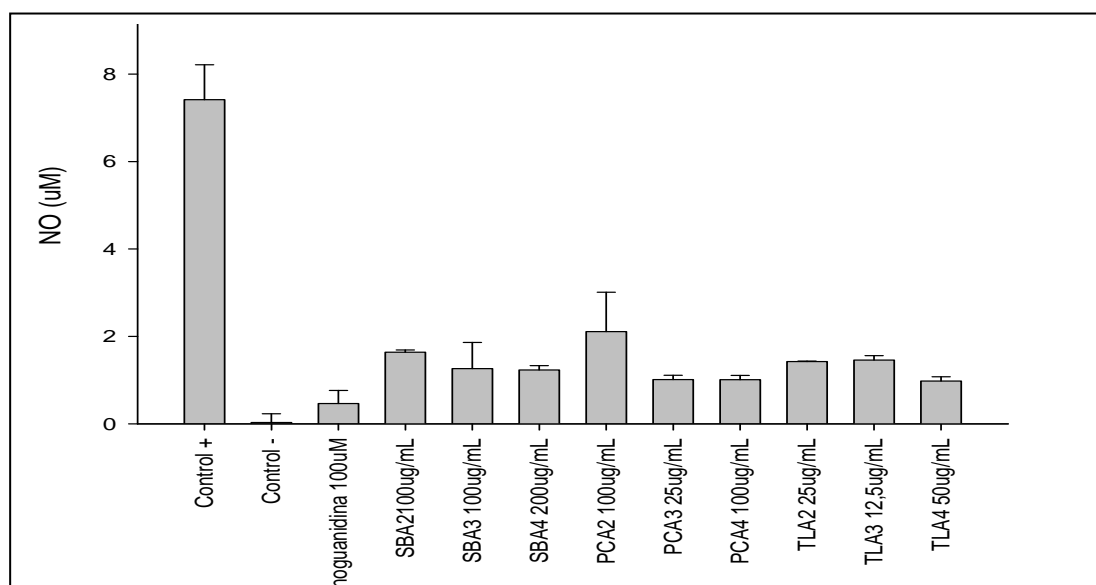


Figura 100. Actividad de las fracciones obtenidas tras el tratamiento con Cetavlon sobre la producción de NO.

En la tabla figuran los máximos valores de inhibición, que en algunos casos es a una concentración de 200µg/mL y en otros a 25µg/mL, los que presentan una concentración menor, es porque a mayores concentraciones, resultaron ser tóxicos.

Muestras purificadas: Los resultados sobre la producción de NO de las fracciones purificadas, se recogen en las tablas 15,16, y 17 y en las figuras 101,102 y 103. Podemos observar como todos los compuestos inhiben significativamente la producción de NO, en macrófagos intraperitoneales de ratón cepa ICR, estimulados con LPS. Los compuestos más activos son TLA sol con un IC₅₀ de 7,4µM, y PCA sol con un valor IC₅₀ de 10,62 y un porcentaje de inhibición 94% que supera a la sustancia de referencia aminoguanidina (93%).

Muestra	NOµM	% Inhibición
Control +	7,24±0,5	-
Control -	0,05±0,2	-
Aminoguanidina 100µM	0,52±0,3*	93%
SBAs 100µg/mL	0,72±0,6*	90%
SBAs 50µg/mL	1,62±0,3*	78%
SBAs 25µg/mL	2,26±0,8*	69%

Tabla15. Actividad antiinflamatoria de las fracciones purificadas SBAsol . Test de la *t*-Student :

*p<0.01 ; **p<0.05

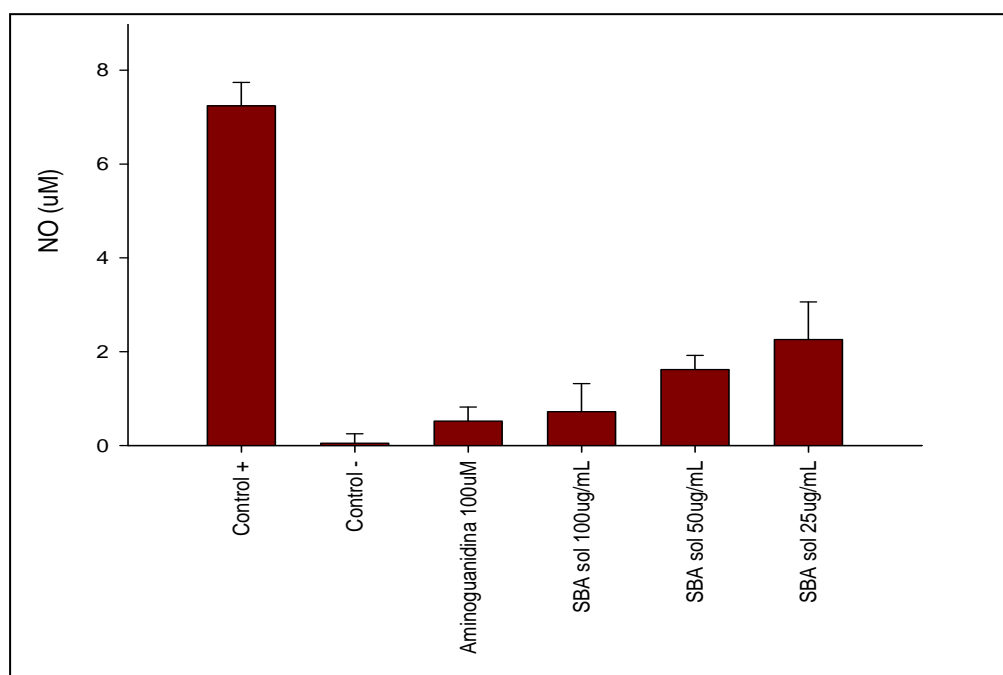


Figura 101. Actividad de las fracciones SBA sol sobre la producción de NO

Muestra	NO μ M	% Inhibición
Control +	7,24 \pm 0,5	-
Control -	0,05 \pm 0,2	-
Aminoguanidina 100 μ M	0,52 \pm 0,3*	93%
PCAs 100 μ g/mL	0,43 \pm 0,6*	94%
PCAs 50 μ g/mL	1,99 \pm 0,6*	72%
PCAs 25 μ g/mL	3,26 \pm 0,4**	55%

Tabla 16. Actividad antiinflamatoria de las fracciones purificadas PCA . Test de la *t*-Student :

* $p < 0.01$; ** $p < 0.05$

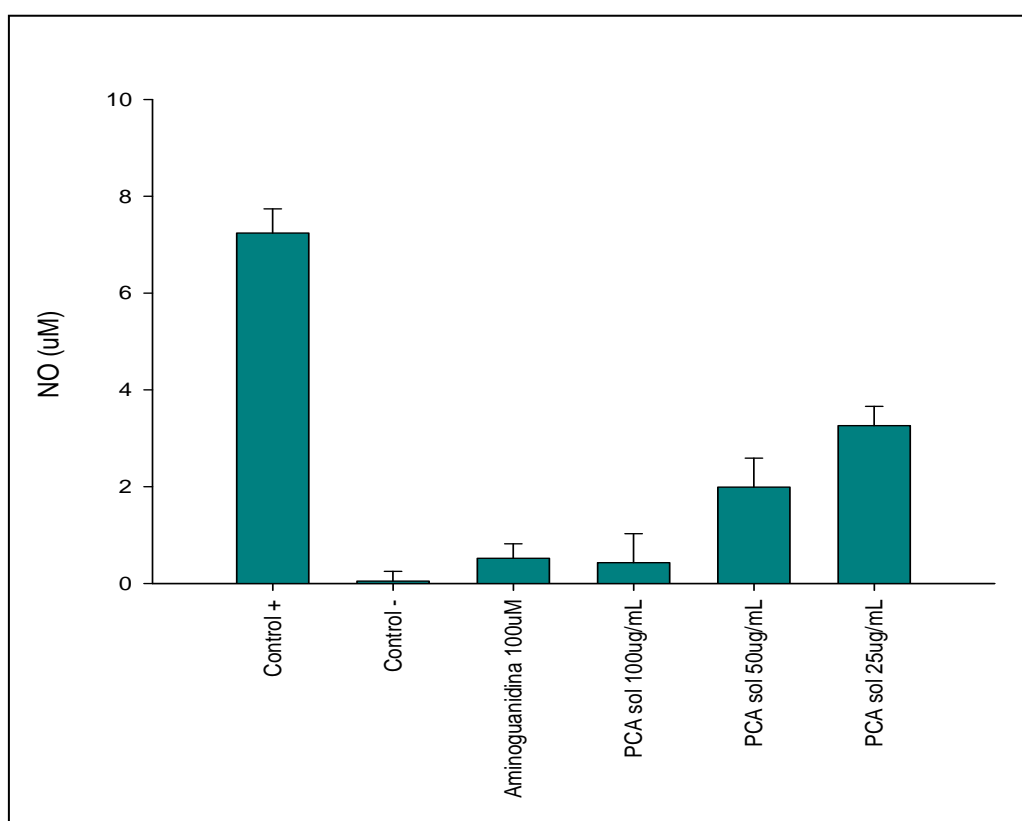


Figura 102. Actividad de las fracciones PCA sol sobre la producción de NO

Muestra	NO μ M	% Inhibición
Control +	7,24 \pm 0,5	-
Control -	0,05 \pm 0,2	-
Aminoguanidina 100 μ M	0,52 \pm 0,3*	93%
TLAs 100 μ g/mL	0,64 \pm 0,3*	91%
TLAs 50 μ g/mL	0,84 \pm 0,6*	88%
TLAs 25 μ g/mL	2,38 \pm 0,4*	67%

Tabla 17. Actividad antiinflamatoria de las fracciones purificadas PCA . Test de la *t*-Student :

* $p < 0.01$; ** $p < 0.05$

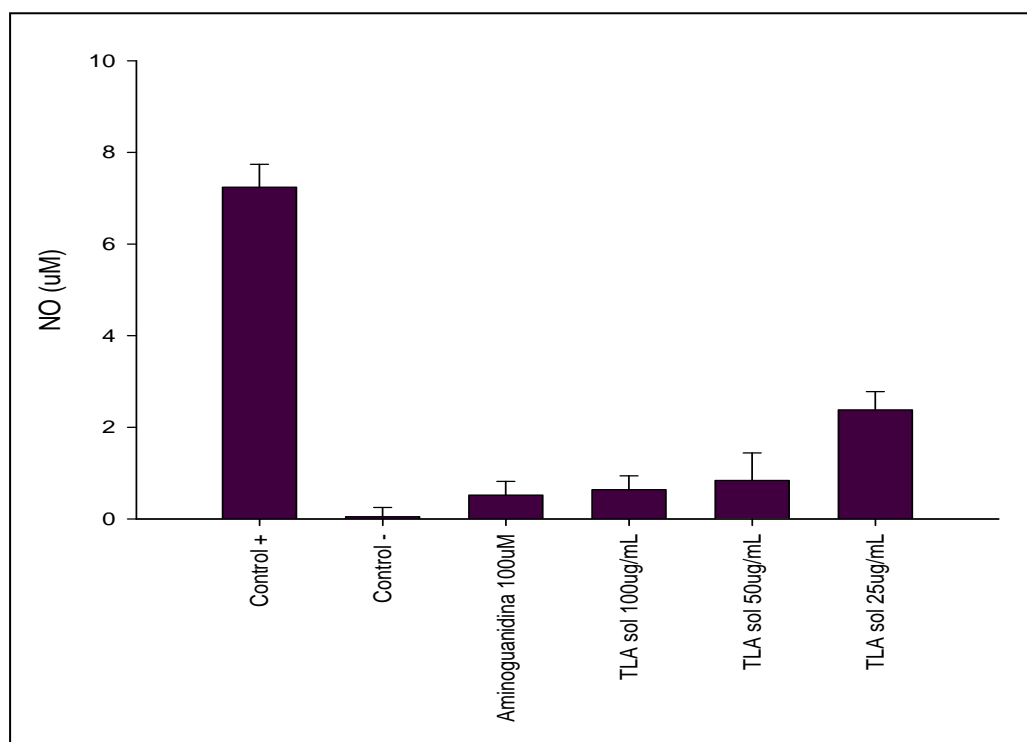


Figura 103 .Actividad de las fracciones TLA sol sobre la producción de NO

9.2.3. Ensayo de actividad anti-inflamatoria. Determinación de TNF- α

Muestras Cetavlon:

Para el ensayo de actividad antiinflamatoria en la determinación de TNF- α , vamos a ensayar las fracciones obtenidas tras el tratamiento con Cetavlon que resultaron mas activas en el ensayo de la determinación de NO, estas fueron: SBA4, PCA4 y TLA4.

Los resultados sobre la producción de $\text{TNF-}\alpha$, se muestran en la tabla 18 y en la figura 104. Todos resultaron ser activos, siendo el más activo PCA4 con un porcentaje de inhibición de 89% y un IC_{50} de $17,55\mu\text{M}$.

Muestra	$\text{TNF-}\alpha \mu\text{M}$	% Inhibición
Control +	$2,95\pm 0,1$	-
Control -	$0,2\pm 0,1$	-
Dexametasona $1\mu\text{M}$	$0,115\pm 0,4^*$	95%
SBA4 $100\mu\text{M}$	$0,50\pm 0,1^*$	77%
PCA4 $100\mu\text{M}$	$0,33\pm 0,1^*$	89%
TLA4 $50\mu\text{M}$	$1,01\pm 0,2^*$	66%

Tabla 18. Actividad antiinflamatoria de SBA4, PCA4 y TLA4, medido a través de la inhibición en la producción de $\text{TNF}\alpha$. Test de la *t*-Student : * $p<0.001$; ** $p<0.05$

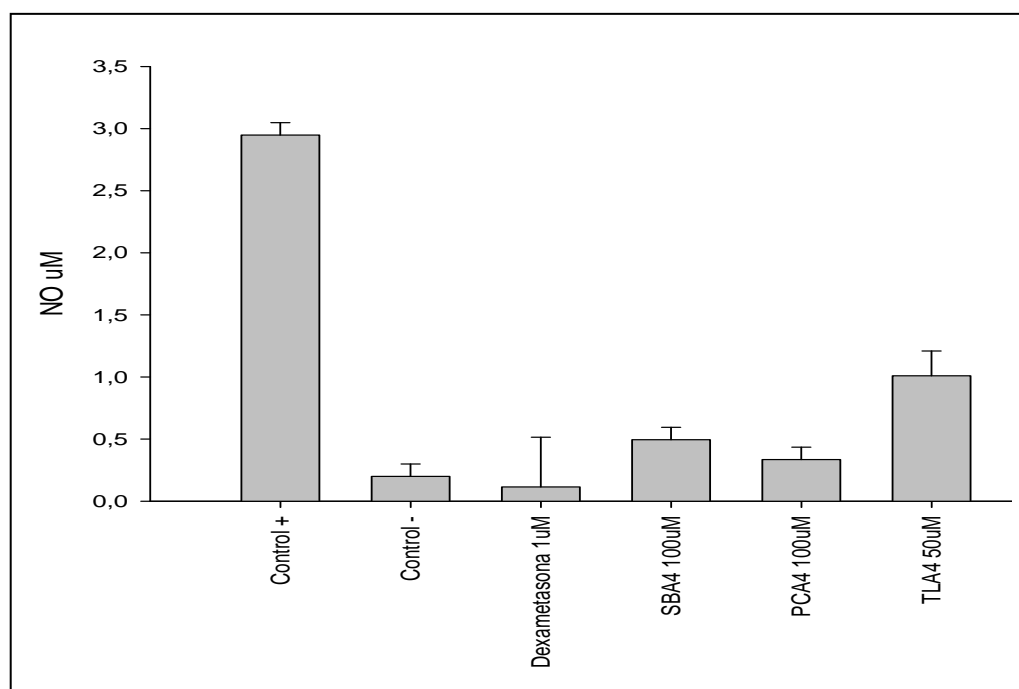


Figura 104. Actividad de las fracciones SBA4, PCA4, y TLA4 sobre la producción de $\text{TNF}\alpha$.

Muestras purificadas:

Los resultados sobre la producción de $\text{TNF}\alpha$ de las fracciones purificadas, se recogen en las tablas 25, 26 y 27 y en las figuras 105, 106 y 107. Podemos observar como todos los compuestos inhiben significativamente la producción de $\text{TNF}\alpha$, en

macrófagos intraperitoneales de ratón cepa ICR, estimulados con LPS, de ellos cabe destacar PC sol que expresa una potencia muy similar a la de la sustancia de referencia dexametasona . ($IC_{50}=0.10\mu M$). Los valores de IC_{50} alcanzados por estos compuestos han sido: SBAs $36,57\mu M$, PCAs $5,25\mu M$, TLAs $18,17\mu M$.

Muestra	TNF- α μM	% Inhibición
Control +	$2,95\pm 0,1$	-
Control -	$0,2\pm 0,1$	-
Dexametasona $1\mu M$	$0,115\pm 0,4^*$	95%
SBAs $100\mu M$	$0,48\pm 0,1^*$	84%
SBAs $50\mu M$	$1,07\pm 0,1^*$	63%
SBAs $25\mu M$	$1,77\pm 0,1^*$	40%

Tabla 25. Actividad antiinflamatoria de SBAs, medido a través de la inhibición en la producción de TNF α . Test de la *t*-Student : * $p<0.01$; ** $p<0.05$

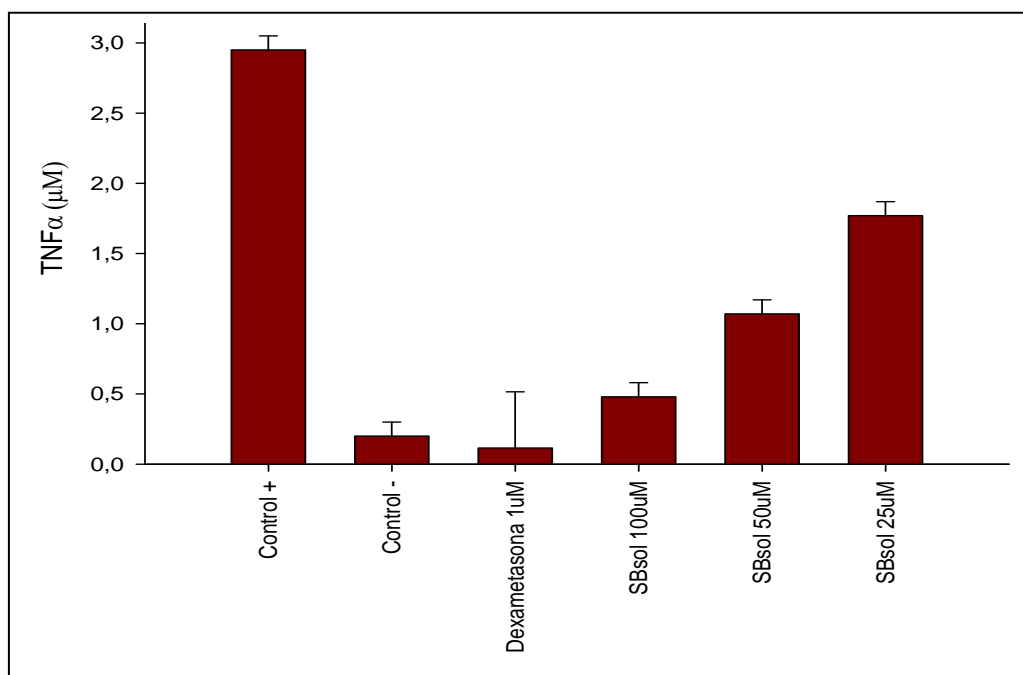


Figura 105. Actividad de las fracción purificada SBAs sobre la producción de TNF α .

Muestra	TNF- α μ M	% Inhibición
Control +	2,95 \pm 0,1	-
Control -	0,2 \pm 0,1	-
Dexametasona 1 μ M	0,115 \pm 0,4*	95%
PCAs 100 μ M	0,26 \pm 0,1*	91%
PCAs 50 μ M	0,68 \pm 0,1*	77%
PCAs 25 μ M	1,07 \pm 0,1*	63%

Tabla 26. Actividad antiinflamatoria de PCAs, medido a través de la inhibición en la producción de TNF α . Test de la *t*-Student : * p <0.01 ; ** p <0.05

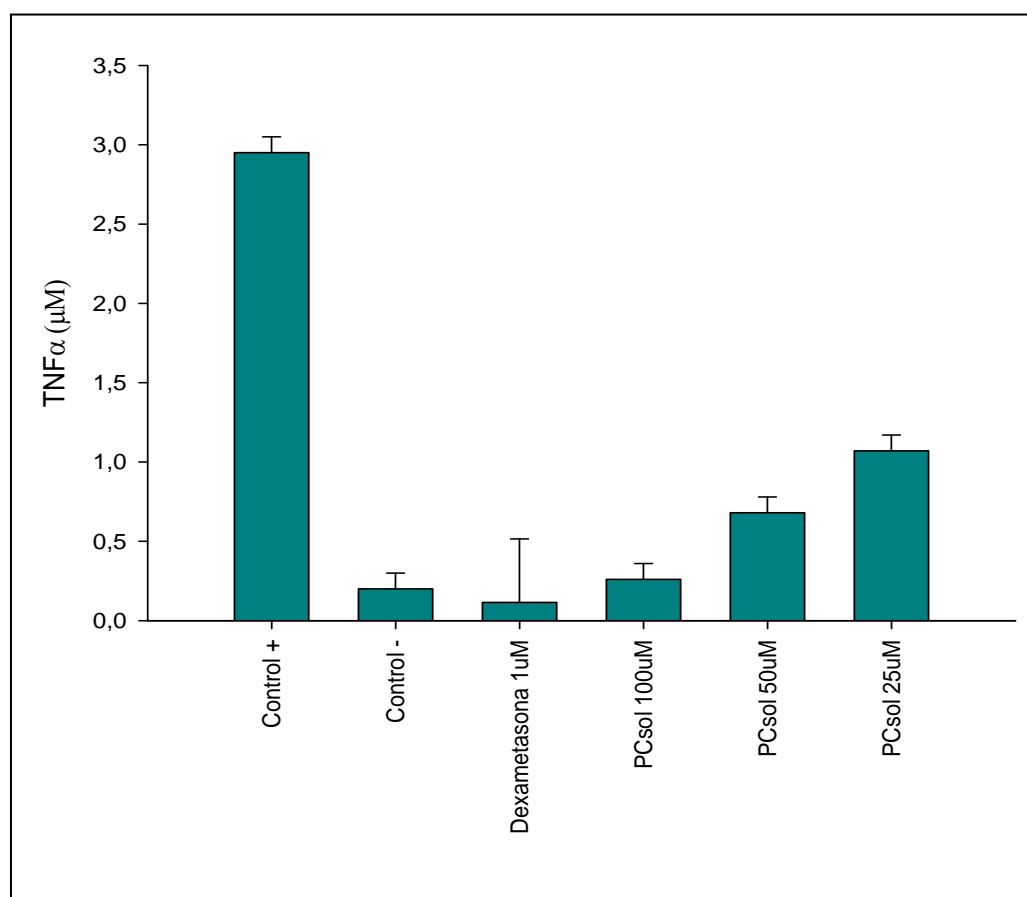


Figura 106. Actividad de las fracción purificada PCAs sobre la producción de TNF α .

Muestra	TNF- α μ M	% Inhibición
Control +	2,95 \pm 0,1	-
Control -	0,2 \pm 0,1	-
Dexametasona 1 μ M	0,115 \pm 0,4*	95%
TLAs 100 μ M	0,70 \pm 0,1*	76%
TLAs 50 μ M	1,05 \pm 0,1*	64%
TLAs 25 μ M	1,54 \pm 0,2*	48%

Tabla 27. Actividad antiinflamatoria de TLAs, medido a través de la inhibición en la producción de TNF α . Test de la *t*-Student : * $p < 0.01$; ** $p < 0.05$

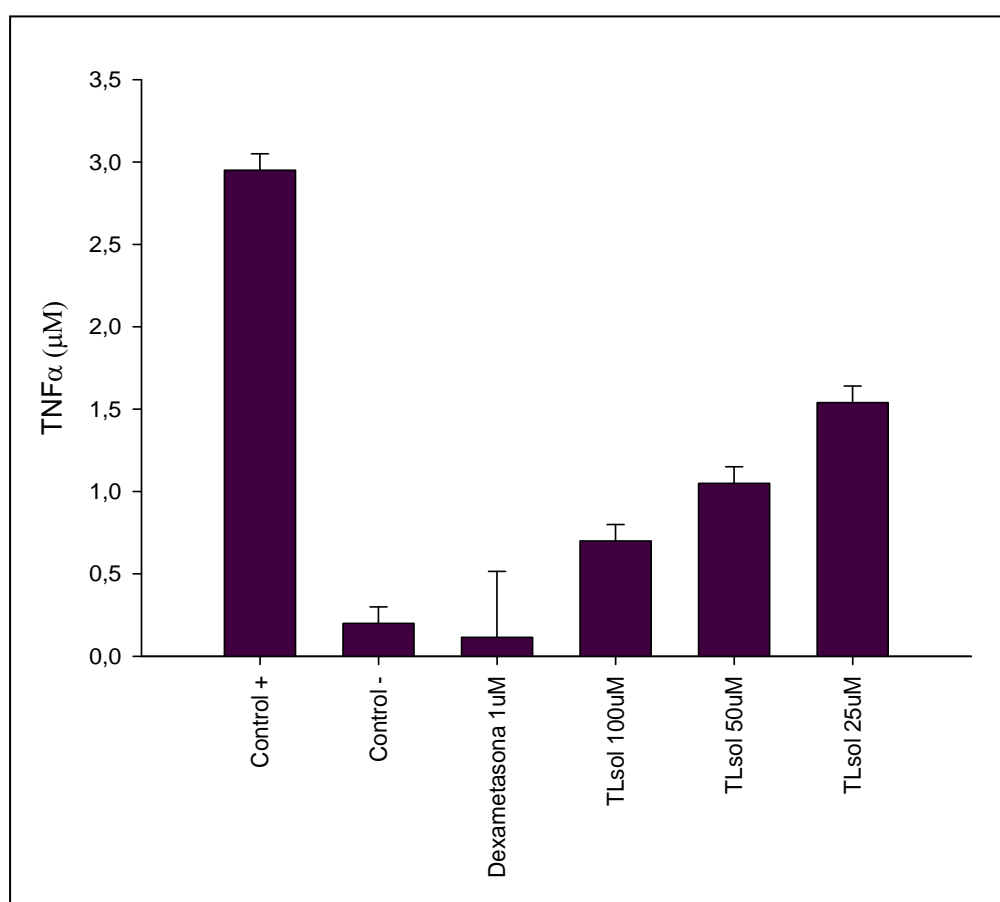


Figura 107. Actividad de las fracción purificada TLAs sobre la producción de TNF α .

DISCUSIÓN

En la búsqueda de nuevas sustancias farmacológicamente activas dentro del reino vegetal existen diversos criterios para elegir el material a estudiar. Uno de ellos es la denominada búsqueda etnobotánica, donde se escogen plantas utilizadas ancestralmente por culturas locales para combatir o paliar determinadas dolencias, plantas que les resultan tóxicas o que les sirven de alimento. Con algunas matizaciones, este tipo de búsqueda coincide con nuestra forma de selección de la materia prima. El desarrollo en la utilización de recursos naturales no sólo incluye el uso directo medicinal, sino también la extracción de los principios activos, su elucidación estructural, y el modelado de nuevas moléculas a partir de ellos, que presenten mayor efecto y menor toxicidad.

En el marco del proyecto de investigación CYTED, se plantea el estudio de diferentes especies de América del Sur, como posibles agentes antivirales. En el presente trabajo, se ha examinado la actividad antiviral de las sumidades floridas de las especies, *Satureja boliviana* (*Lamiaceae*), y *Phoradendron crassifolium* (*Loranthaceae*), especies recogidas en el Altiplano Boliviano, así como una especie anteriormente estudiada por nuestro grupo de trabajo, *Tuberaria lignosa* (*Cistaceae*), recogida en la zona centro de la Península Ibérica.

El uso tradicional de la familia *Cistaceae* nos habla de especies diuréticas, antipiréticas, antiulcerosas y fijadoras aromáticas, muy útiles en perfumería. La especie *T. lignosa* es utilizada en medicina tradicional en procesos inflamatorios y desinfección de heridas (Pieroni *et al.*, 2006) y se ha atribuido al extracto acuoso una acción antiulcerosa, antiinflamatoria (Yesilada *et al.*, 1997) y también antiviral, siendo responsable de esta última actividad su riqueza en elagitánicos (Bedoya *et al.*, 2001, Bedoya *et al.*, 2010).

El género *Satureja*, perteneciente a la familia *Lamiaceae* (*Labiatae*) y que agrupa 200 especies aromáticas, se utiliza tradicionalmente en forma de cataplasma para el reumatismo, para la migraña, el “sorotje” o mal de altura, como estomáquico, para lavar heridas infectadas, y en resfriados. Es un género reconocido por sus numerosos efectos terapéuticos y diferentes especies presentan efectos analgésicos (De Rojas 1999), antisépticos, antimicrobianos (Tumen *et al.*, 2000, Aeri *et al.*, 2006, Saadat *et al.*, 2004, Azaz *et al.*, 2005, Sefidkon *et al.*, 2004, Eftekhar *et al.*, 2009, Skocibusic *et al.*, 2008), antivirales (Abad *et al.*, 1999, Yamasaki *et al.*, 1998), antioxidantes debido sobre todo a sus aceites esenciales (Madsen *et al.*, 1998, Radonic and Milos, 2003, Exarchou *et al.*, 2002, Basiri *et al.*, 2007, Ortet *et al.*, 2009), protectores de la toxicidad a la ciclofosfamida utilizada para el tratamiento de cáncer

(Redvanfar *et al.*, 2008), antiproliferativos, antiprotozoarios (Tariku *et al.*, 2010), antifúngicos (Boyras and Ozcan 2006, Sokovic *et al.*, 2002, Glamoclija *et al.*, 2006), antidiabéticos (Basin *et al.*, 2007, Saadat *et al.*, 2004), antiinflamatorios con efectos similares a prednisolona e indometacina (Amanlou *et al.*, 2005, Ghazanfari *et al.*, 2006), anticolinesterasa (Silva *et al.*, 2009), y actividad vasodilatadora.

El género *Phoradendron*, *muérdago americano*, ha sido usado en medicina popular para el dolor de cabeza, como antiinflamatorio, y en el tratamiento de tumores epiteliales (Stein *et al.*, 1998), de desórdenes femeninos, gastrointestinales, como analgésico, gripe y como vermífugo (Agra *et al.*, 2007; Días *et al.*, 2007). En infusión, para dolores reumáticos, cólicos nefríticos, en cataplasma, para el dolor de cabeza, dolor reumático, fracturas y como antiinflamatorio (Girault *et al.*, 1987; Oblitas *et al.*, 1992; Muschietti *et al.*, 1996).

Diversas especies de este género poseen actividad antitumoral en general (Braun *et al.*, 2002, Endo *et al.*, 1989, Johanson *et al.*, 2003, Ríos *et al.*, 2001, Jacobo-Salcedo *et al.*, 2011). Li *et al.* (2002) describen una proteína capaz de unirse al DNA, antiinflamatoria y antioxidante (Vasconcellos *et al.*, 2009), y en la especie empleada en el presente trabajo se ha descrito actividad protectora gástrica y antiviral (Gonzales *et al.*, 2000, Abad *et al.*, 1999,).

El objetivo de este trabajo persigue el descubrimiento, obtención y caracterización de nuevos compuestos de origen natural frente a virus, destacando y profundizando en la actividad sobre el VIH, virus responsable del SIDA, en su baja toxicidad y su potencial uso como agentes terapéuticos. Aunque ya existe un largo arsenal terapéutico contra el VIH, la aparición de efectos secundarios, la dificultad en el seguimiento terapéutico por parte del paciente y la elevada capacidad replicativa del VIH, conlleva un aumento de la variabilidad, que se traduce en la aparición de variantes virales resistentes a fármacos. De ahí la necesidad de obtener nuevas moléculas con actividad anti-VIH con al menos igual potencia pero menos tóxicos y que estén dirigidos preferiblemente a diferentes etapas del ciclo biológico. La aparición de nuevas formas de administrar los agentes antivirales abre un escaparate a la aplicación de nuevas tecnologías encaminadas a mejorar la prevención de la enfermedad previa al tratamiento (Terris-Prestholt *et al.*, 2013), que los pacientes podrían aplicarse correctamente, facilitando el seguimiento terapéutico (Friend *et al.*, 2013).

Dado que dos de las plantas utilizadas son especies americanas de origen boliviano cuya recolección se escapa a nuestro control, se ha considerado importante establecer las bases micrográficas de reconocimiento de las especies, que permitan

identificar el material enviado desde Bolivia, a fin de aislar el/los principio/s responsables de la actividad antiviral puesta de manifiesto en el presente trabajo. Se procedió por tanto a realizar los ensayos de identificación como se hace habitualmente antes de emplear una droga en terapéutica. Estos ensayos permiten la identificación y posibles adulteraciones dando información adicional sobre su estado de conservación, ya que de ello dependerá su eficacia. Se realizaron ensayos botánicos microscópicos y no de identificación histológica debido a que la droga se recibió de forma pulverizada, identificando a través de los elementos y contenidos celulares las especies y drogas correspondientes.

Los extractos fueron evaluados mediante técnicas de cribado que nos permiten una evaluación rápida de su toxicidad y actividad antiviral. Como paso preliminar en el cribado y caracterización de la actividad antiviral de cada planta, se obtuvo el extracto etanólico y acuoso, como representantes de las formas de administración más utilizadas tradicionalmente.

Para realizar el ensayo de actividad antiviral hemos escogido, en primer lugar, el ensayo de protección del efecto citopático (ECP), donde se evalúa la actividad antiviral además de la posible toxicidad de los extractos, sin tener en cuenta la fase del ciclo viral en la que intervienen. En el caso de VIH el ensayo que hemos realizado es el de viabilidad celular, que mide la actividad antiviral de forma indirecta sin cuantificar la replicación del VIH, pero tiene la ventaja de permitir la evaluación simultánea de la actividad y la toxicidad de los extractos.

En primer lugar se ensayaron los extractos acuosos y etanólicos de las distintas especies sobre una batería de cuatro virus representativos: VHS, VSV, Poliovirus tipo-1 y VIH con diferente morfología (Virus ADN con envuelta, ARN, ARN con envuelta y retrovirus ARN con envuelta, respectivamente), estudiando su mecanismo de multiplicación y la toxicidad de los extractos sobre células HeLa (células de carcinoma de útero humano) y células MT-2 y RAJI DC-SIGN (líneas celulares linfoblastoides) en el caso de VIH.

Como se esperaba, los extractos etanólicos han resultado más tóxicos sobre las células HeLa, RAJI y MT-2 que los extractos acuosos, detectándose toxicidad a concentraciones inferiores a las necesarias para inhibir la infección por el virus. Por ello, se descartó la evaluación de su potencial actividad antiviral a mayores concentraciones. Por tanto, la actividad antiviral reside mayoritariamente en los extractos acuosos, como ya se había descrito en otros trabajos (Sánchez Palomino *et al.*, 2002, Bedoya *et al.*, 2005). Ninguno de los extractos ensayados resultó ser activo

frente al virus de la polio, pero todos presentaron actividad frente a los restantes virus excepto el extracto de PCA sobre VSV.

El extracto acuoso de *P. crassifolium* (PCA) es efectivo frente al VHS en un rango de concentración de 125 a 500 µg/mL, presentando un IC₅₀ de 48,09 µM. Los mejores resultados fueron conseguidos con los extractos acuosos de *S. boliviana* (SBA), con un rango de actividad antiviral sobre VHS de 10-50 µg/mL e IC₅₀ 30 µM, aunque resulta ser algo mas tóxico que el anterior.

Frente al VSV, resulta activo el extracto acuoso de la especie *S. boliviana* (SBA), que inhibe la replicación de este virus en un rango de concentración de 50 a 250 µg/mL con un IC₅₀ 18,49 µM.

En cuanto a *Tuberaria lignosa* (TLA), tanto el extracto acuoso en un rango de concentración de 20 a 50 µg/mL y con un IC₅₀ de 37,15 µM, como el extracto etanólico (TLB) en un rango de 25-100 µg/mL con IC₅₀ 34,19 µM, resultan ser activos.

A la vista de estos resultados, se decidió profundizar en el estudio, frente a todos los virus ensayados, de los extractos acuosos activos, teniendo presente que son la forma tradicional de utilización de estas especies medicinales, descartando los etanólicos. También se descartó la posibilidad de aumentar el rango de concentraciones de los extractos etanólicos debido a la clara falta de actividad en estos extractos y a la citotoxicidad de los mismos.

Para de tratar de aislar los compuestos responsables de la actividad, y una vez liofilizadas las infusiones activas, solubilizamos con etanol 70°, obteniendo para cada infusión una fracción soluble en etanol y otra que precipita en las mismas condiciones, fraccionando de esta manera los principios activos solubilizados en el agua.

Antes de comenzar con el ensayo de actividad antiviral, se dializaron los extractos contra agua con el fin de eliminar las moléculas de pequeño tamaño de la preparación. De este modo, hemos evaluado la actividad de las macromoléculas y polímeros con tamaño mayor de 12-14 kDa.

Para los ensayos de actividad antiviral de las distintas fracciones se ha escogido un rango de concentración que va de 0-250 µg/mL, teniendo en cuenta los resultados obtenidos con los extractos totales. Asimismo, para el seguimiento de la actividad antiviral y en base a los resultados anteriores, se ensayaron las fracciones obtenidas de la infusión de *Phoradendron. crassifolium* frente al VHS, las de *Satureja boliviana* frente al VSV, y las de *Tuberaria lignosa* frente al VIH.

El ensayo de las fracciones de *P. crassifolium* sobre VHS, demostró que la fracción soluble en etanol PCA0 no es activa, ya que la viabilidad de las células en

presencia del virus se mantuvo constante independientemente de la concentración de extracto añadida.

Además, a partir de 100 µg/mL resulta tóxica para las células HeLa. La fracción insoluble en etanol PCA1, presentó una clara actividad antiviral a partir de 125 µg/mL, con IC₅₀ 145µM, llegando a recuperar hasta un 70% de las células infectadas.

El ensayo de actividad antiviral sobre VSV se llevó a cabo con las fracciones soluble e insoluble en etanol de la infusión de *S. boliviana*. Al igual que en el caso anterior, la actividad reside mayoritariamente en la fracción insoluble (SBA1), recuperando cerca de un 90% de las células infectadas a 50 µg/mL (IC₅₀ 9,6µM).

En el ensayo de actividad antiviral sobre VIH con *T. lignosa* se observaron niveles similares de actividad para los dos extractos, soluble (TLA0) e insoluble (TLA1), en todo el intervalo de concentraciones ensayado, recuperando cerca del 80% de las células infectadas, con IC₅₀ de 31,50 µM y 40,33 µM respectivamente. Ambos extractos presentaron diferente grado de citotoxicidad, que en TLA0 comenzó a una concentración de 60 µg/mL, mientras que en la fracción precipitada TLA1 no se detectó a la máxima concentración ensayada y por tanto es mayor de 100 µg/mL.

A la vista de los resultados obtenidos en estos ensayos nos pareció sumamente interesante concentrarnos en el estudio de las fracciones insolubles en etanol, que resultaron ser las más activas. El alto peso molecular de la muestra, que queda retenida en una membrana de diálisis de tamaño de corte 12-14 kDa, junto con el hecho de haberla obtenido de una infusión precipitada con etanol (los taninos deberían haber quedado en el extracto soluble en etanol), nos hace sospechar de su posible naturaleza polisacáridica.

Antes de continuar con la purificación se realizaron una serie de reacciones cualitativas con objeto de acercarnos a determinar la naturaleza química de los extractos seleccionados. Para ello, determinamos el contenido en azúcares totales, proteínas y ácidos urónicos en las fracciones seleccionadas, concluyendo que las muestras insolubles en etanol y que resultan ser activas frente a virus, son ricas en azúcares y ácidos urónicos. También procedimos a realizar una cromatografía en capa fina, procediendo previamente a una hidrólisis, que nos dio una idea sobre la composición en azúcares de los extractos. El comportamiento de las fracciones en las distintas pruebas cromatográficas nos ayudó a fijar los solventes y las condiciones idóneas para obtener un mejor fraccionamiento y análisis de las mismas.

Como resultado, se comprobó que todas las fracciones diferían únicamente en la cantidad de monosacáridos. Se trata de polisacáridos, cuya composición aproximada en monosacáridos sería: glucosa, arabinosa, manosa, galactosa, xilosa,

ramnosa y ácido galacturónico diferenciándose en el azúcar principal que para el caso de SBA es glucosa, presentando además mayor proporción de ácido galacturónico y arabinosa en el caso de TLA y PCA.

Estos precipitados en etanol, ricos en polisacáridos, fueron dializados frente a agua en membranas de exclusión de 12-14 kDa y posteriormente fraccionados mediante el método de Cetavlon® (Zhang *et al.*, 1997). Este reactivo es una sal de amonio cuaternario capaz de unirse a los radicales ácidos presentes en la muestra, produciendo su precipitación. Este método de aislamiento es uno de los mas habituales utilizados en el aislamiento de polisacaridos dotados de actividad farmacologica y que aparece reseñado en diferentes publicaciones (Yamada *et al.*, 1989, 1990, 1991, Kiyohara *et al.*, 1990, Cañigual *et al.*, 1993, Zhao *et al.*, 1993, Sakurai *et al.*, 1996, Zhang *et al.*, 1997, Eyncor *et al.*, 2008) nos permitió separar, en función de su acidez, tres subfracciones: una fuertemente ácida, otra débilmente ácida y otra neutra. Se comprobó que todas las fracciones (excepto SBA-3) contenían cantidades variables de carbohidratos neutros, aunque la proporción de este tipo de compuestos fue menor de lo esperado si el tratamiento con Cetavlon hubiera conducido a una precipitación selectiva de polisacáridos. Con objeto de determinar si los compuestos aislados presentaban algún componente fenólico y, en su caso, comprobar de qué tipo era, se hicieron también una serie de ensayos cualitativos. Tal y como se esperaba, concluimos que no existían ni taninos elágicos, ni catequinas, pero sí algún otro tipo de compuesto fenólico.

En todo caso, este fraccionamiento nos llevó a una mayor purificación de diferentes componentes de los extractos, ya que los resultados obtenidos del análisis mediante CG-EM indicaron que las fracciones neutra, débilmente ácida y fuertemente ácida de cada uno de ellos se diferenciaban en la proporción de ácido galacturónico. Pero este mismo análisis cromatográfico reveló además, la existencia de otros compuestos no glucídicos, tales como ácido azelaico, subérico y palmítico, mediante la comparación de sus espectros de masas con los recogidos en la base de datos Wiley-NIST08. Los ácidos grasos pueden proceder, probablemente, de las paredes celulares de tejidos epidérmicos. Algunos de estos resultados fueron corroborados por los espectros de ¹H-RMN, en los que aparecen señales atribuibles a glicerol y a lípidos, observándose una señal más intensa en la región anomérica de carbohidratos en las fracciones en las que se detectó mayor contenido en carbohidratos neutros, que se corresponderían con las fracciones neutras obtenidas tras el tratamiento con Cetavlon®, TLA-4, SBA-4 y PCA-4. Las señales de carbohidratos de las fracciones débilmente ácidas y

fuertemente ácidas, TLA-2, SBA-2, PCA-2, TLA.3, SBA-3 y PCA-3 fueron débiles o inexistentes, confirmando los datos químicos.

Con estos datos, decidimos proseguir el estudio solo con las fracciones neutras, PCA-4, TLA-4 y SBA-4 y tratar de abordar la purificación de compuestos activos a partir de ellas.

Para ello, recurrimos a la cromatografía de exclusión molecular, pero el resultado de esta separación cromatográfica rindió fracciones con la misma composición en monosacáridos y con sustancias no glucídicas, que eluían conjuntamente con los polisacáridos y que dificultaron claramente la obtención de fracciones glucídicas limpias.

Las fracciones obtenidas tras el paso cromatográfico resultaron tener diferente grado de actividad antiviral. Se comprobó que aquéllas que presentaban un mayor peso molecular y/o eran mayoritarias en polisacáridos, con menor proporción de componentes no glucídicos, tenían mayor actividad. Estudios recientes apuntan que existe una relación entre la actividad antiviral de polisacáridos y su peso molecular (Dong C.X. *et al.*, 2012).

Puesto que todas las fracciones seguían conteniendo componentes no glucídicos incluso tras su paso por la columna de exclusión molecular se varió la estrategia de purificación, utilizando un tratamiento alcalino seguido de una precipitación con etanol y diálisis para tratar de eliminar proteínas, lípidos y otros compuestos susceptibles de ser degradados y/o solubilizados en estas condiciones.

Tras la eliminación de la mayoría de los componentes no glucídicos, comprobamos que la actividad antiviral se mantenía, lo que nos hizo apuntar directamente a los polisacáridos presentes en los extractos como responsables de la misma.

A pesar de haber conseguido eliminar las impurezas no glucídicas, la precipitación con Cetavlon[®], como ya hemos comentado anteriormente, no permitió separar polisacáridos con distinta composición en monosacáridos. La parte glucídica, aunque aparecía en mayor proporción en las fracciones neutras, se presentaba repartida entre todas y además tras el intento de purificación se obtuvieron mezclas excesivamente complejas, difíciles de tratar, y de caracterizar. Por todo ello, y tratando de recuperar la mayor cantidad de carbohidratos posible, retornamos a los extractos originales, tratándolos primero con álcali, precipitación con alcohol y posterior diálisis contra agua, donde se eliminaron los productos de degradación no deseados, y nos quedaron muestras enriquecidas en carbohidratos.

Como resultado de este tratamiento, se obtuvieron dos fracciones, una mayoritaria (4-5 veces más abundante), soluble en agua (PCAs, SBAs y TLAs), con un contenido en azúcares neutros de entre 66-73% y otra insoluble (PCAi, SBAi y TLAi), con 23,7-41.1% de carbohidratos neutros y mayor contenido en ácidos urónicos, posiblemente responsables de su difícil disolución. El análisis de monosacáridos de las fracciones solubles e insolubles de las tres especies demostró que contenían los mismos componentes, aunque en distintas proporciones, siendo la arabinosa y la glucosa los componentes más abundantes en todos los casos. Las fracciones insolubles contenían además una elevada proporción de ácido galacturónico, lo que justificaba su resistencia a la hidrólisis ácida y su extrema insolubilidad. Teniendo en cuenta la composición detectada en las fracciones insolubles, podemos sugerir que contienen material de naturaleza péctica. Las pectinas son elementos estructurales presentes en la pared celular primaria y en las regiones intercelulares de plantas superiores que cumplen, entre otras, funciones estructurales y de mantenimiento de la hidratación. La estructura de los polisacáridos pécticos es variada. Los homogalacturonanos están formados por cadenas de ácido galacturónico, más o menos esterificado, unido mediante enlaces α -(1→4), mientras que los ramnogalacturonanos I y II contienen monosacáridos neutros en su estructura (Thakur *et al.*, 1997). En nuestro caso, la fracción aislada parece ser una pectina insoluble en agua, lo que corresponde con polímeros de alta masa molecular y bajo grado de esterificación. La insolubilidad de este material no permitió su ulterior caracterización mediante las técnicas físico-químicas a nuestro alcance.

Sin embargo, los tipos de unión glicosídica entre los monosacáridos de las tres fracciones solubles pudieron ser deducidos a partir del análisis de metilación, demostrando que se trataba de polisacáridos ramificados extremadamente complejos. La naturaleza de estos tipos de enlace coincidía en su mayoría para las tres muestras, aunque se detectaron cambios sustanciales en sus proporciones como puede observarse en la tabla 9.

Del análisis conjunto de los resultados cromatográficos y de RMN mono y bidimensional, se desprende que las fracciones solubles contienen una mezcla de polisacáridos pécticos. Los componentes del *arabinano* y de los *arabinogalactanos I* (AGI) y *II* (AGII), polímeros que conforman las cadenas laterales neutras del ramnogalacturonano I (RG-I) (Fig.XXX), aparecen representadas en diferentes cantidades en las tres muestras estudiadas. El *arabinano* está formado por unidades de α -arabinofuranosa (α -Araf) unidas mediante enlace (1→5), ramificada en sus posiciones O-2 y O-3 por una α -Araf. El *arabinogalactano I* es una cadena de α -

A pesar de que en esta fracción se detectó también (1→4)-Galp, los resultados no permiten confirmar la presencia de *arabinogalactano I* (AGI), ya que no se hallaron unidades de (1→3,4)-Galp características de dicho polímero.

Además se detectó también glucopiranososa, principalmente unida en (1→4), cuya presencia ha sido descrita en otros extractos pécticos (Westereng *et al.*, 2008) y pequeñas cantidades de manosa.

Fracción TLA soluble. También en este material el componente mayoritario es la (1→5)-arabinofuranosa, bastante ramificada en O-2 y O-3, sugiriendo la existencia de *arabinano*. La cantidad de galactopiranososa en este caso es mucho menor, y está unida principalmente mediante enlaces (1→3,6), (1→3) y (1→6), compatibles con la estructura del *arabinogalactano II* (AGII). Pero además, en este caso se detectó (1→3,4)-Galp junto con (1→4)-Galp lo que concuerda con la presencia de *arabinogalactano I* (AGI), y pequeñas cantidades de manosa.

Fracción SBA soluble. En esta fracción, el componente más abundantes es (1→4)-Glc p (17,2%). Como se ha comentado anteriormente, este tipo de unidades ha sido descrito en muestras similares, pero no es componente de las pectinas. Un componente de la hemicelulosa, el xiloglucano, contiene este tipo de unidades, pero la ausencia de xilosa detectable en la muestra descarta la presencia de dicho polímero. Otros polisacáridos vegetales ricos en estas unidades son la celulosa y el almidón. El primero es el polisacárido estructural por excelencia, altamente insoluble, mayoritario en la pared celular vegetal y formado por una cadena lineal de (1→4)-β-Glc p. El almidón es el polisacárido de reserva de las células vegetales y químicamente es un (1→4)-α-glucano, parcialmente ramificado en O-6 en sus cadenas de amilopectina. Con los datos de los que disponemos, no es fácil discernir de cuál de los dos polímeros se trata, aunque quizá sea más plausible que se trate de una pequeña cantidad de celulosa solubilizada durante el tratamiento.

El segundo tipo de enlace predominante es (1→3,6)-Galp (14,1%). La presencia de este compuesto y de cantidades menores de enlaces (1→3)- y (1→6)-Galp y (1→3)- y (1→5)-Araf indica que el material analizado contiene también una cantidad considerable de AGII.

La arabinosa se encuentra principalmente enlazada como (1→5)-Araf, (1→2,5)-Araf y (1→3,5)-Araf. Por ello, se deduce que esta fracción contiene *arabinano*, aunque en

proporción menor que la muestra PCA soluble, lo que coincide con los datos derivados del análisis de monosacáridos.

Por último, la presencia de (1→4)-Galp y (1→3,4)-Galp concuerda con la presencia de *arabinogalactano I* (AGI) en la fracción soluble de SBA.

Para evaluar la actividad antiviral de las fracciones solubles de las tres especies, comenzamos trabajando con una batería de virus representativos donde se encontraban virus ADN, ARN, con envuelta, sin envuelta y retrovirus. Los resultados, en los cuales se puso de manifiesto la acción antiherpética y antiVIH de las fracciones sin presentar acción sobre el virus de la Polio, nos condujeron a pensar que la envuelta del virus estaba implicada en dicha actividad, ya que tanto VHS como VIH la poseen mientras que en Polio no existe. Numerosos estudios describen una acción antiviral de polisacáridos en VIH y VHS, apuntando que actúan inhibiendo la adsorción del virus a células Vero (Bouhlal *et al.*, 2011) (Mandal *et al.*, 2010). En el caso de fucoidanos, su acción antiherpética es bien conocida y ahora se describe también su acción anti-VIH (Trinchero *et al.*, 2009), así como la de los carragenanos tanto “*in vitro*” como “*in vivo*” (Altini *et al.*, 2010) o la de la celulosa sulfato activa en VHS-1 y VHS-2 (Anderson *et al.*, 2000). En un estudio reciente, se describe una acción sobre la envuelta del VHS-2 similar a la que se describe para la envuelta del VIH. Los polisacáridos neutros parecen ejercer su acción principalmente mediante la inhibición en la adsorción del virus a la membrana de la célula huésped. De acuerdo con la opinión más aceptada, la interacción entre el VHS-2 y las cadenas de heparin sulfato (HS), depende de las asociaciones múltiples entre la carga positiva de residuos aminoacídicos de los sitios de unión HS-glicoproteínas virales y la carga negativa de los grupos sulfato/carboxilato de las cadenas de HS (Dong *et al.*, 2012).

Este hecho, también nos lleva a plantearnos cual sería el mecanismo de acción. Podríamos pensar que tendría que ver con la envuelta y la unión del virus a la célula para infectarla, en este caso estaríamos hablando de la fase temprana en el proceso de infección del virus, donde se produce la adsorción y la fusión de la partícula viral a la célula. La primera etapa de la infección por VIH es la fijación y la entrada del virus en la célula, y para ello ciertas células como los linfocitos T, monocitos/macrófagos y otras, presentan en su superficie el antígeno CD4+. Se produce una interacción de alta afinidad entre una proteína de la cubierta gp 120 del virus, y el antígeno CD4 de la superficie celular. Este reconocimiento es condición obligada para que el virus llegue a penetrar en la célula, y va seguido de un cambio conformacional en la proteína gp120 (Gatell *et al.*, 2011).

La interacción inicial entre el VIH y la célula, puede ser facilitado por interacciones no específicas entre dominios con carga positiva en gp120, y proteoglicanos con carga negativa en la membrana celular, o por interacciones específicas con lectinas tipo C o heparanatos como las moléculas DC-SIGN o L-SIGN de la superficie celular de células dendríticas o macrófagos tisulares. Este último caso, denominado sinapsis viral, es llevado a cabo por estas células presentadoras de antígenos, que pueden capturar las partículas virales vía receptores de lectinas tipo C (DC-SIGN), para luego presentarlas a los linfocitos CD4+. Según se plantea en estudios llevados a cabo con polisacáridos, su acción estaría relacionada con el ataque del virión a la célula huésped, tal es el caso de los ya estudiados polisacáridos sulfatados, como los carragenanos (McGowen *et al.*, 2006), otros polisacáridos también extraídos de algas (Morya *et al.*, 2012). (Wijesinghe & Jeon, 2012), (Haslin *et al.*, 2001), (Bouhlal *et al.*, 2011), (Poli *et al.*, 2010), (Esteves *et al.*, 2011), (Harden *et al.*, 2009), (Zhu *et al.*, 2006), (Wang *et al.*, 2010a), (Bandyopadhyay *et al.*, 2011), (Ohta *et al.*, 2009), y los extraídos de plantas terrestres (Wang *et al.*, 2008b), (Sakagami *et al.*, 2011). (Bandyopadhyay *et al.*, 2011). Algunos polisacáridos que presentan manosa en su estructura resultan ser activos. Al unirse a los receptores manosa específicos de las células dendríticas y evitar al tiempo la unión del propio virus, se produce una competición, y por tanto se evita que posteriormente sea presentado a las células T (Martinez Avila *et al.*, 2009).

Esta unión a estructuras celulares o adhesión, podría ser nuestro caso, una posible diana para nuestros compuestos, por ello, en el presente trabajo realizamos dos ensayos; en un primer caso, el ensayo de inhibición de la infección en *trans* mediada por células Raji DC-SIGN, las células dendríticas presentes en el tracto genital, son una de las primeras células que se encuentra el VIH durante la transmisión sexual por la mucosa. (Nasr, *et al.*, 2014), son donde incubamos previamente nuestros compuestos con las células dendríticas presentadoras de antígenos. La preincubación de polisacáridos con las células antes que con virus es necesario para que la inhibición sea efectiva. (Bouhlal *et al.*, 2011). Las muestras TLAs y PCAs resultaron ser las mas activas, presentando un 50% y un 49% de inhibición, con un IC50 de 78,7 µg/mL y 73µg/mL respectivamente. Estos dos compuestos contienen en su composición una pequeña cantidad de manosa, que podría actuar uniéndose al receptor DC-SIGN, y por tanto bloqueando la unión del propio virus a la célula presentadora de antígeno, la célula dendrítica. Los valores de inhibición no son muy llamativos probablemente debido a la mínima cantidad de manosa presente en los mismos. Según Martinez–Avila *et al.*, en un estudio llevado a cabo en 2009, se describe como diferentes densidades de oligomanósidos presentan diferente actividad,

decreciente a medida que disminuye la densidad, un 10% de densidad en manosa presenta menor actividad antiviral que un 50%.

El segundo ensayo que hemos realizado es el ensayo de neutralización, donde intentamos descubrir si se produce una actuación directa sobre la partícula viral, desestructurando su envuelta, o uniéndose inespecíficamente a las glicoproteínas gp120 o gp41, bloqueando entonces su unión al receptor. La preincubación de los compuestos durante 30 minutos produciría la pérdida de infectividad del virus si su mecanismo de acción fuese el antes descrito como efectivamente ocurre con nuestras muestras, donde todas se mostraron activas, destacando los compuestos SBAs, SBAi, PCAi, y PCAs que presentan un IC₅₀ de 1,8µg/mL, 24µg/mL, 2,4 µg/mL y 2,71µg/mL respectivamente. En cuanto a las fracciones, tras Cromatografía de Exclusión Molecular, que muestran mayor actividad anti-VIH por este ensayo de neutralización, tenemos PCAs1, TLAs1 y TLAs2, con un IC₅₀ de 1,17µg/mL, 1,31µg/mL y 1,16µg/mL, aunque respecto a las fracciones anteriores pierden algo de actividad. Posiblemente al someter las muestras a SEC se han podido perder algunas moléculas que favorecían la propia actividad.

Varios autores han propuesto que la interacción con la glicoproteína viral gp120 se produce por compuestos polianiónicos. Los inhibidores polianiónicos de VIH-1 comprenden una familia de compuestos que son generalmente considerados inhibidores de la entrada, describiendo interacciones electrostáticas, incluso algunos detallan que la interacción se produce con el dominio V3 de la gp120, (Scordi-Bello *et al.*, 2005), estos son carragenano, celulosa sulfato, poliestireno sulfonato (Pirrone *et al.*, 2011) y albúminas cargadas negativamente.

Nuestros compuestos describen una actividad antiviral dosis dependiente, y algo importante es que tanto en el ensayo de neutralización como en el de DC-SIGN tratamos el virus y las células dendríticas respectivamente con los compuestos, antes de efectuar la infección o el contacto célula-virus y ello determina, que la actividad se produce en las fases previas a la infección y no inmediatamente después de infectar, actúa antes de que el virus entre en contacto con la célula.

Lo que sí queda claro es que nuestros compuestos actúan neutralizando el virus a nivel de la membrana, es decir bloqueando algún receptor. Posiblemente al tratarse de polisacáridos pécticos es decir, compuestos polianiónicos, se unan por interacción electrostática no específica al receptor gp120 con carga positiva, desestructurando la partícula viral, o inactivando su capacidad de infección y esta unión a estructuras celulares, podría actuar simplemente como un mecanismo de retención del compuesto hasta que este ejerciese su acción. Los viricidas son un grupo de inhibidores cuya

acción es precisamente esta, de tal forma que podríamos englobar nuestros compuestos dentro de este grupo. Un estudio reciente describe actividad antiviral de un polisacárido péctico aislado de *Portulacca oleracea* L. (Portulacaceae). Este polisacárido es una pectina con cantidades apreciables de ácido galacturónico, galactosa, ramnosa y arabinosa (Dong *et al.*, 2010).

Entre 1999 y 2013 se han realizado 24 estudios clínicos en fase II y III. De éstos, 20 se han completado y de ellos 6 han demostrado efectividad en la prevención de VIH, la mayoría de los estudios con éxito fueron para profilaxis, preexposición en administración oral, y solo un ensayo con microbicida tópico en forma de gel ha resultado ser efectivo. (Gengiah, *et al.*, 2014).

El principal inconveniente de los polisacáridos parece ser su baja biodisponibilidad por vía oral (Peng *et al.*, 2008) y la trombocitopenia en administración intravenosa. Esto provoca que únicamente puedan ser utilizados como antivirales de uso tópico (de Clerq *et al.*, 1995).

De hecho, es importante destacar que ya desde hace una década se están desarrollando formulaciones en forma de geles con polisacáridos como microbicidas, es decir aplicados en las mucosas, para prevenir infecciones. En el apartado de agentes antivirales, se han descrito los microbicidas hasta ahora ensayados y su uso actual.

La mayoría de los ensayos clínicos realizados con candidatos a microbicidas entre los que encontramos algún polisacárido como el sulfato de celulosa, parecen presentar gran actividad viricida en un amplio espectro de patógenos en enfermedades de transmisión sexual (McGowan *et al.*, 2006) pero a la vez son capaces de irritar la mucosa, dando lugar a un proceso inflamatorio que favorece la infección. El VIH para infectar las células diana debe evitar una serie de barreras mecánicas, químicas y biológicas intrínsecas, la estructura del tracto genital femenino constituye la primera línea de defensa contra el VIH. (Kaushic *et al.*, 2010). Es importante destacar que el mal estado de la mucosa favorece la infección por VIH, es por ello que la inflamación resulta ser un factor determinante a la hora de exponer las células que forman parte de la mucosa con el virus. El riesgo de transmisión, por tanto, es favorecido si la flora normal es destruida o alterada, si se reducen los factores innatos de protección, o si se daña o inflama la integridad del epitelio protector de la mucosa. (Haase, *et al.*, 2011). Actualmente sabemos que la inflamación de las mucosas es un activador importante de la infección (Ashley *et al.*, 2010)

La tendencia actual, es aplicar esos agentes anti-VIH en una base de gel no irritante, que es mejor tolerado por el tracto genital femenino que los surfactantes, los

tampones ácidos y los polímeros aniónicos, (Roberts *et al.*, 2012). O incluso aplicar los propios microbicidas junto a agentes, que en aplicación tópica, regulen la concentración de citoquinas en el tracto vaginal, como el agente glicerol-monolaurato, que regula a la baja, la concentración de citoquinas proinflamatorias y probablemente como consecuencia de esto previene la infección por el virus de la inmunodeficiencia en simios (VIS) (Li *et al.* 2009). Actualmente se está estudiando adaptar agentes anti-VIH como ITINNs, junto a ciclodextrinas o celulosas formuladas como geles, y que resulten favorables en aplicación tópica sin que alteren la mucosa y a la vez que no se pierda actividad (Grammen, *et al.*, 2014).

Hemos medido la actividad antiinflamatoria pues, como ya hemos descrito, numerosos agentes anti-VIH son activos frente al virus pero su acción se acompaña de un aumento en la producción de citokinas muchas de ellas proinflamatorias y como ya sabemos tanto la inflamación del epitelio vaginal y rectal así como la irritación de la mucosa derivada en ocasiones por enfermedades de transmisión sexual, favorecen la infección y transmisión del VIH (McGowan, *et al.*, 2006, McGowan, *et al.*, 2014). Recientemente se describe una acción antiinflamatoria de un peptidoglicano que reduce los niveles tanto de la NO sintasa inducible (NOi), como la ciclooxigenasa (COX-2) (Wu, *et al.*, 2013).

En el presente trabajo, medimos la actividad antiinflamatoria a través del análisis de dos citokinas proinflamatorias, NO y TNF α , utilizando modelos “*in vitro*”, y centrándonos en la cuantificación de dichos mediadores de la inflamación. Una vez que hemos obtenido los cultivos de macrófagos, los vamos a estimular con LPS con objeto de que aumente la producción de determinados mediadores de la inflamación y comprobar si los compuestos a probar son capaces o no, de inhibir la liberación de eicosanoides por las células. Estos ensayos se realizaron tanto en las fracciones obtenidas tras el tratamiento de Cetavlon, como las muestras purificadas. Como resultado, hemos obtenido en general una disminución en la producción tanto de NO como de TNF α , siendo en el caso de NO, TLAs y PCAs los más activos presentando un porcentaje de inhibición que el caso de PCAs se iguala a la sustancia de referencia, aminoguanidina, y en el caso de TNF α , PCAs la más activa muy cerca de igualarse a la inhibición provocada por dexametasona. En 2009 Vasconcellos *et al.*, describen actividad antiinflamatoria en *Phoradendron piperoides* (Kunth) Trel. (*Loranthaceae*).

Todo ello, nos hace pensar, que posiblemente podrían tratarse de compuestos que no alteren la mucosa, y esto, unido a su actividad antiviral, nos conduce a pensar en ellos como posibles candidatos a microbicidas.

Es importante destacar, respecto a los polisacáridos, que una idea que ha surgido recientemente es la introducción de grupos funcionales, que cambian la polaridad, conformación o la masa, y favorecen o aumentan la actividad antiviral. Esto se constata muy bien en un estudio llevado a cabo en 2011, donde se produce la modificación química de un polisacárido neutro extraído de *Polygonatum cyrtonema* Hua, una planta de las Liliáceas muy utilizada en medicina tradicional china. En ese trabajo, se crearon derivados sulfatados, fosforilados, acetilados, y sulfonilados, comparando su actividad antiherpética frente al polisacárido natural, usando el ensayo de inhibición del efecto citopático en células Vero y se describe como los derivados fosforilado y sulfatado resultan ser más activos que el polisacárido neutro aislado inicialmente (Liu *et al.*, 2011a). Otros trabajos describen como la sustitución de grupos hidroxiglucanos en grupos sulfato mejora la actividad antiviral (Ray, *et al.*, 2013). Esto ocurre con un polisacárido extraído y posteriormente sulfatado químicamente del *Indocalamus tessdatus* L., una planta medicinal china, traducándose en un aumento de su actividad anti-HIV, al igual que con polisacáridos extraídos de *Astragalus bidentata*, *Polygonatum sibiricum* Redoute y el glucomanano (Huang *et al.*, 2008). Otro estudio actual describe la posibilidad de ser usado como un agente oral para reducir la severidad de VHS cutáneo y las lesiones en la mucosa, y mas importante, como un microbicida bloqueando la transmisión sexual de VHS-2 genital (Cardozo, *et al.*, 2013). Y ya para finalizar, un estudio reciente, pone de manifiesto la actividad anti-VIH, en diferentes modelos de infección y de transmisión “*in vitro*” de carbohidratos glicano específicos, que además poseen la propiedad de no afectar a las bacterias comensales propias de la mucosa y que la protegen, siendo candidatos potenciales a microbicidas (Petrova, *et al.*, 2013).

CONCLUSIONES

1. Las tres especies estudiadas, *Phoradendron crassifolium*, *Tuberaria lignosa* y *Satureja boliviana*, presentan actividad antiviral, residiendo la actividad principalmente en el extracto acuoso.
2. Los compuestos con actividad frente a VIH y actividad antiinflamatoria, se han identificado como polisacáridos pécticos ramificados, donde la mayoría de los tipos de unidades identificados en las tres muestras son los mismos, con cambios sustanciales en sus proporciones.
3. Se ha podido establecer la actividad antiVIH de los compuestos activos de las tres especies tanto mediante el ensayo en *trans* DC-SING, como a través del ensayo de neutralización, con virus recombinantes portadores del gen marcador *luciferasa*.
4. El grado de toxicidad de los compuestos evaluados mediante el ensayo de viabilidad celular y ECP, resultó ser muy leve o nulo.
5. Los compuestos PCAs y SBAs, así como las fracciones TLAs1, TLAs2 y PCAs1 destacan en su actividad antiVIH, y actúan en la fase temprana del ciclo de replicación del VIH, en concreto en la adsorción del virus a las células. Todos ellos son envuelta VIH dependiente y dosis dependiente, posiblemente al tratarse de polisacáridos polianiónicos manifiesten interacciones electrostáticas con el receptor gp120 de la envuelta del VIH.
6. Todos los compuestos ensayados han manifestado efectos antiinflamatorios significativos *in vitro* sobre los dos mediadores ensayados, NO y TNF α , pudiendo contribuir por tanto a la actividad antiinflamatoria de las tres especies estudiadas.
7. Dado que dos de las especies, *Satureja boliviana* y *Phoradendron crassifolium*, americanas, cuya recolección se escapa a nuestro control, se dejan establecidas las bases micrográficas de reconocimiento que permitan identificar el material vegetal de nuevos envíos.

BIBLIOGRAFÍA

- Abad, M.J., Bermejo, P., Villar, A., Palomino, S.S., Carrasco, L. (1997). **Antiviral activity of medicinal plant extracts.** *Phytotherapy Research* 11, 198-202.
- Abad, M.J., Bermejo, P., Gonzales, E., Iglesias, I., Irurzun, A., Carrasco, L. (1999). **Antiviral activity of Bolivian plant extracts.** *General Pharmacology* 32, 499-503.
- Abad, M.J., Guerra, J.A., Bermejo, P., Irurzun, A., Carrasco, L. (2000). **Search for antiviral activity in higher plant extracts.** *Phytotherapy Research* 14, 604-607.
- Abad, M.J., Bessa, A.L., Ballarin, B., Aragón, O., Gonzales, E., Bermejo, P. (2006). **Anti-inflammatory activity of four Bolivian *Baccharis* species (Compositae).** *Journal of Ethnopharmacology* 103, 338-344.
- Abad, M.J., Bedoya, L.M., Bermejo, P. (2008). **Natural marine anti-inflammatory products.** *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* 8, 740-754.
- Abdala-Díaz, R.T., Chabrigon, M., Cabello-Pasini, A., Lopez-Soler, B., Figueroa, F.L. (2010). **Effect of *Porphyridium cruentum* polysaccharides on the activity of murine macrophage cell line RAW 264.7.** *Ciencias Marinas* 36, 345-353.
- Abdool-Karim, Q., Abdool-Karim, S.S., Frohlich, J.A., Grobler, A.C., Baxter, C., Mansoor, L.E., Kharsany, A.B., Sibeko, S., Mlisana, K.P., Omar, Z., Gengiah, T.N., Maarschalk, S., Arulappan, N., Mlotshwa, M., Morris, L., Taylor, D. (2010). **Effectiveness and safety of tenofovir gel, an antiretroviral microbicide, for the prevention of HIV infection in women.** *Science* 329, 1168-1174.
- Adachi, A., Gendelman, H.E., Koenig, S., Folks, T., Willey, R., Rabson, A., Martín, M.A. (1986). **Production of acquired immunodeficiency syndrome-associated retrovirus in human and non-human cells transfected with an infectious molecular clone.** *Journal of Virology* 59, 284-291.
- Agra, M.F., Baracho, G.S., Nurit, K., Basilio, I.J.L.D., Coelho, V.P.M. (2007). **Medicinal and poisonous diversity of the flora of "Cariri Paraibano", Brazil.** *Journal of Ethnopharmacology* 111, 383-395.
- Ahn, M., Kim, C., Lee, J., Kim, T., Kim, S., Lee, C., Lee, B., Shin, C., Huh, H., Kim, J. (2002). **Inhibition of HIV-1 integrase by galloyl glucoses from *Terminalia chebula* and flavonol glycoside gallates from *Euphorbia pekinensis*.** *Planta Medica* 68, 457-459.
- Ahn, M.J., Yoon, K.D., Min, S.Y., Lee, J.S., Kim, J.H., Kim, T.G., Kim, S.H., Kim, N.G., Huh, H., Kim, J. (2004). **Inhibition of HIV-1 reverse transcriptase and protease by phlorotannins from the brown alga *Ecklonia cava*.** *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 27, 544-547.
- Ahrazem, O., Leal, J., Prieto, A., Jimenez-Barbero, J., Bernabe, M. (2001). **Chemical structure of a polysaccharide isolated from the cell wall of *Arachniotus verruculosus* and *A. ruber*.** *Carbohydrate Research* 336, 325-328.
- Ahrazem, O., Prieto, A., Gimenez-Abian, M.I., Leal, J.A., Jimenez-Barbero, J., Bernabe, M. (2006). **Structural elucidation of fungal polysaccharides isolated from the cell wall of *Plectosphaerella cucumerina* and *Verticillium* spp.** *Carbohydrate Research* 341, 246-252.
- Ahrazem, O., Prieto, A., Leal, J.A., Gimenez-Abian, M.I., Jimenez-Barbero, J., Bernabe, M. (2007). **Fungal cell wall polysaccharides isolated from *Discula destructiva* spp.** *Carbohydrate Research* 342, 1138-1143.
- Aiken, C., Chen, C. (2005). **Betulinic acid derivatives as HIV-1 antivirals.** *Trends in Molecular Medicine* 11, 31-36.

- Alavi, A., Goodfellow, L., Fraser, O., Tarelli, E., Bland, M., Axford, J. (2011). **A double-blind, randomized, placebo-controlled study to explore the efficacy of a dietary plant-derived polysaccharide supplement in patients with rheumatoid arthritis.** *Rheumatology* 50, 1111-1119.
- Alcamí, J., Rullas, J.B., M., Alonso, J., García, J., González, N., Beltrán, M., Gatell, J., Clotet, B., Podzamczar, D., Miró, J., Mallolas, J. (2002). **Inmunopatología del SIDA.** En: "Guía Práctica del SIDA: Clínica, Diagnóstico y Tratamiento", Ed. Masson, Barcelona, España.
- Alcamí, J. (2008). **The HIV replication cycle: established therapeutic targets and potential targets.** *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 26, 3-10.
- Ali, A.M., Mackeen, M.M., Intan-Safinar, I., Hamid, M., Lajis, N.H., ElSharkawy, S.H., Murakoshi, M. (1996). **Antitumour-promoting and antitumour activities of the crude extract from the leaves of *Juniperus chinensis*.** *Journal of Ethnopharmacology* 53, 165-169.
- Altini, L., Blanchard, K., Coetzee, N., Elias, C., Ellertson, C., Friedland, B., Hoosen, A., Jones, H.E., Marumo, M., Mc Grory, E., Monedi, C., Ndlovu, G., Nkompala, B., Pistorius, A., Ramjee, G., Sebola, M., Sorhaindo, A., Norris-Turner, A., Tweedy, K., Wijgert., V.S., Williams, M.M., Winikoff, B. (2010). **Expanded safety and acceptability of the candidate microbicide vaginal carraguard in South Africa.** *Contraception* 82, 563-571.
- Amagase, H., Sun, B.X., Nance, D.M. (2009). **Immunomodulatory effects of a standardized *Lycium barbarum* fruit juice in Chinese older healthy human subjects.** *Journal of Medicinal Food* 12, 1159-1165.
- Amanlou, M., Dadkhah, F., Salehnia, A., Farsam, H., Dehpour, A.R. (2005). **An anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of hydroalcoholic extract of *Satureja khuzistanica* Jamzad extract.** *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences* 8, 102-106.
- An, T., Ouyang, W., Pan, W., Guo, D., Li, J., Li, L., Chen, G., Yang, J., Wu, S., Tien, P. (2012). **Amino acid derivatives of the (-) enantiomer of gossypol are effective fusion inhibitors of human immunodeficiency virus type 1.** *Antiviral Research* 94, 276-287.
- Anderson, P.L., Kiser, J.J., Gardner, E.M., Rower, J.E., Meditz, A., Grant, R.M. (2011). **Pharmacological considerations for tenofovir and emtricitabine to prevent HIV infection.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 66, 240-250.
- Andrei, G., Snoeck, R. (2011). **Emerging drugs for varicella-zoster virus infections.** *Expert Opinion on Emerging Drugs* 16, 507-535.
- Anon, T.J. (2005). **Anti-inflammatory and antitumour activities of water soluble polysaccharides isolated from a macrofungus *Phellinus rimosus* (Berk) Pilat.** *Indian Journal of Medical Research* 121, 131-132.
- Arena, A., Maugeri, T.L., Pavone, B., Iannello, D., Gugliandolo, C., Bisignano, G. (2006). **Antiviral and immunoregulatory effect of a novel exopolysaccharide from a marine thermotolerant *Bacillus licheniformis*.** *International Immunopharmacology* 6, 8-13.
- Arena, A., Gugliandolo, C., Stassi, G., Pavone, B., Iannello, D., Bisignano, G., Maugeri, T.L. (2009). **An exopolysaccharide produced by *Geobacillus***

- thermodenitrificans* strain B3-72: antiviral activity on immunocompetent cells.** *Immunology Letters* 123, 132-137.
- Arenzana-Seisdedos, F., Virelizier, J.L., Rousset, D., Clark-Lewis, I., Loetscher, P., Moser, B., Baggiolini, M. (1996). **HIV blocked by chemokine antagonist.** *Nature* 383, 400.
 - Arhel, N.J., Souquere-Besse, S., Munier, S., Souque, P., Guadagnini, S., Rutherford, S., Prévost, M.C., Allen, T.D., Charneau, P. (2007). **HIV-1 DNA flap formation promotes uncoating of the pre-integration complex at the nuclear pore.** *EMBO Journal* 26, 3025-3037.
 - Artan, M., Karadeniz, F., Karagozlu, M.Z., Kim, M., Kim, S. (2010). **Anti-HIV-1 activity of low molecular weight sulfated chito-oligosaccharides.** *Carbohydrate Research* 345, 656-662.
 - Asano, J., Chiba, K., Tada, M., Yoshii, T. (1996). **Antiviral activity of lignans and their glycosides from *Justicia procumbens*.** *Phytochemistry* 42, 713-717.
 - Ashley, A. (2010). **Targeting early infection to prevent HIV-1 mucosal transmission.** *Nature* 464, 217-223.
 - Ashour, M.L., Wink, M. (2011). **Genus *Bupleurum*: a review of its phytochemistry, pharmacology and modes of action.** *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 63, 305-321.
 - Assreuy, A.M.S., Pontes, G.C., Rodrigues, N., Gomes, D.M., Xavier, P.A., Araujo, G.S., Sampaio, A.H., Cavada, B.S., Pereira, M.G., Farias, W.R.L. (2010). **Vascular effects of a sulfated polysaccharide from the red marine alga *Solieria filiformis*.** *Natural Product Communications* 5, 1267-1272.
 - Avendaño, C. (1993). **Introducción a la Química Farmacéutica**, Ed. Toronto Interamericana, Toronto, Canada.
 - Aydin, S., Ozturk, Y., Beis, R., Baser, K.H.C. (1996). **Investigation of *Origanum onites*, *Sideritis congesta* and *Satureja cuneifolia* essential oils for analgesic activity.** *Phytoterapy Research* 10, 342-344.
 - Ayisi, N.K., Nyadedzor, C. (2003). **Comparative *in vitro* effects of AZT and extracts of *Ocimum gratissimum*, *Ficus polita*, *Clausena anisata*, *Alchornea cordifolia* and *Elaeophorbium drupifera* against HIV-1 and HIV-2 infections.** *Antiviral Research* 58, 25-33.
 - Baek, S.H., Lee, J.G., Park, S.Y., Bae, O.N., Kim, D.H., Park, J.H. (2010). **Pectic polysaccharides from *Panax ginseng* as the anti-rotavirus principals in ginseng.** *Biomacromolecules* 11, 2044-2052.
 - Balzarini, J., Schols, D., Neyts, J., Vandamme, E., Peumans, W., de Clercq, E. (1991). **α -(1-3)-D-mannose-specific and α -(1-6)-D-mannose-specific plant-lectins are markedly inhibitory to human-immunodeficiency-virus and cytomegalovirus infections *in vitro*.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 35, 410-416.
 - Balzarini, J., Van Laethem, K., Hatse, S., Vermeire, K., de Clercq, E., Egberink, H., Vander Mooter G., Peumans W., Van Damme E., Schols, D. (2004). **Mannose-specific plant lectins from the Amaryllidaceae family qualify as efficient microbicides to prevent infection and transmission of the human immunodeficiency virus.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48, 3858-3870.
 - Balzarini, J., Van Laethem, K., Peumans, W.J., Van Damme, E.J., Bolmsstedt, A. Gago, F. (2006). **Mutational pathways, resistance profile, and side effects of**

- cyanovirin relative to human immunodeficiency virus type 1 strain with N-glycan deletions in their gp120 envelopes. *Journal of Virology* 80, 8411-8421.
- Balzarini, J., Van Damme, L. (2007). **Microbicide drug candidates to prevent HIV infection.** *The Lancet* 369, 787-797.
 - Bandyopadhyaya, S.S., Navid, M.H., Ghosh, T., Schnitzler, P., Ray, B. (2011). **Structural features and *in vitro* antiviral activities of sulfated polysaccharides from *Sphacelaria indica*.** *Phytochemistry* 72, 276-283.
 - Banskota, A.H., Tezuka, Y., Prasain, J.K., Matsushige, K., Saiki, I., Kadota, S. (1998). **Chemical constituents of Brazilian propolis and their cytotoxic activities.** *Journal of Natural Products* 61, 896-900.
 - Bao, J., Zhang, D.W., Zhang, J.Z.H., Huang, P.L., Huang, P.L., Lee-Huang, S. (2007). **Computational study of bindings of olive leaf extract (OLE) to HIV-1 fusion protein gp41.** *FEBS Letters* 581, 2737-2742.
 - Barahona, T., Chandia, N.P., Encinas, M.V., Matsushiro, B., Zuniga, E.A. (2011). **Antioxidant capacity of sulfated polysaccharides from seaweeds: a kinetic approach.** *Food Hydrocolloids* 25, 529-535.
 - Barber, G.N. (2005). **VSV-tumor selective replication and protein translation.** *Oncogene* 24, 7710-7719.
 - Barbosa, P., Lima, A.S., Vieira, P., Dias, L.S., Tinoco, M.T., Barroso, J.G., Pedro, L.G., Figueiredo, A.C., Mota, M. (2012). **Nematicidal activity of essential oils and volatiles derived from Portuguese aromatic flora against the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*.** *Journal of Nematology* 42, 8-16.
 - Barker, S.A., Bourne, E.J., Wiffen, D.M. (1956). **Use of infrared analysis in the determination of carbohydrate structure.** *Methods of Biochemical Analysis* 3, 213-245.
 - Barnabas, R.V., Webb, E.L., Weiss, H.A., Wasserheit, J.N. (2011). **The role of coinfections in HIV epidemic trajectory and positive prevention: a systematic review and meta-analysis.** *AIDS* 25, 1559-1573.
 - Baser, K.H.C. (2008). **Biological and pharmacological activities of carvacrol and carvacrol bearing essential oils.** *Current Pharmaceutical Design* 14, 3106-3119.
 - Basiri, S., Esmaily, H., Vosough-Ghanbari, S., Mohammadirad, A., Yasa, N., Abdollahi, M. (2007). **Improvement by *Satureja khuzestanica* essential oil of malathion-induced red blood cells pesticide.** *Biochemical Physiology* 89, 124-129.
 - Bauer, S. (2012). **Mass spectrometry for characterizing plant cell wall polysaccharides.** *Frontiers in Plant Science* 3, 45-50.
 - Beattie, K.D., Ulrich, R., Grice, I.D., Uddin, S.J., Blake, T.B., Wood, K.A., Steele, J., Lu, F., May, T.W., Tiralongo, E. (2011). **Ethanollic and aqueous extracts derived from Australian fungi inhibit cancer cell growth *in vitro*.** *Mycologia* 103, 458-465.
 - Bedoya, L.M., Sanchez-Palomino, S., Abad, M.J., Bermejo, P., Alcamí, J. (2001). **Anti-HIV activity of medicinal plant extracts.** *Journal of Ethnopharmacology* 77, 113-116.
 - Bedoya, L.M., Beltrán, M., Sancho, R., Olmedo, D., Sánchez, S., del Olmo, E., López, J., Muñoz, E., San Feliciano, A., Alcamí, J. (2005). **4-Phenylcoumarins as HIV transcription inhibitors.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 15, 4447-4450.
 - Bedoya, L.M., Márquez, N., Martínez, N., Gutiérrez, S., Álvarez, A., Calzado, M., Rojas, J., Appendino, G., Muñoz, E., Alcamí, J. (2009). **SJ23B, a jatrophone**

- diterpene activates classical PKCs and displays strong activity against HIV *in vitro*.** *Biochemical Pharmacology* 77, 965-978.
- Bedoya, L.M., Abad, M.J., Sanchez-Palomino, S., Alcami, J., Bermejo, P. (2010). **Ellagitannins from *Tuberaria lignosa* as entry inhibitors of HIV.** *Phytomedicine* 17, 69-74.
 - Ben-Aoun, Z., Ben-Said, R., Farhat, F. (2010). **Anti-inflammatory, antioxidant and antimicrobial activities of aqueous and organic extracts from *Dictyopteris membranacea*.** *Botanica Marina* 53, 259-264.
 - Berger, E.A. (1997). **HIV entry and tropism: the chemokine receptor connection.** *AIDS* 11, S3-S16.
 - Bergmann, F., Yagen, B., Jarvis, B.B. (1992). **The toxicity of macrocyclic trichotecenes administered directly into the rat brain.** *Toxicon* 30, 1291-1294.
 - Bermejo, P. (1982). **Contribución al Estudio Farmacognóstico de *Nepeta nepetella* L. (Labiatae),** Tesis Doctoral, Departamento Farmacología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid.
 - Bermejo, P., Abad, M.J., Diaz, A.M., Fernández, De Santos, J., Sánchez, S., Villaescusa, L., Carrasco, L., Irurzun, A. (2002). Antiviral activity of seven iridoids, three saikosaponins and one phenylpropanoid glycoside extracted from *Bupleurum rigidum* and *Scrophularia scorodonia*. *Planta Medica* 68(2):106-10 **NUEVO**
 - Beuscher, N., Bodinet, C., Neumannhaefelin, D., Marston, A., Hostettmann, K. (1994). **Antiviral activity of African medicinal plants.** *Journal of Ethnopharmacology* 42, 101-109.
 - Bianchi, N.R., Machado, C.A., Silva, M.O. (1992). **Estudo da toxicidade de algumas especies utilizadas em afeccoes gastrointestinaes.** XII Simposio de Plantas Medicinales do Brasil, Curitiba. P.R., Brasil.
 - Bitter, T., Muir, H.M., (1962) **A modified uronic acid carbazole reaction.** *Analytical Biochemistry* 4,330-334.
 - Bleau, C., Monges, A., Rashidan, K., Laverdure, J.P., Lacroix, M., Van Calsteren, M.R., Millette, M., Savard, R., Lamontagne, L. (2010). **Intermediate chains of exopolysaccharides from *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M increase IL-10 production by macrophages.** *Journal of Applied Microbiology* 108, 666-675.
 - Bouhlal, R., Haslin, C., Chermann, J.C., Collic-Jouault, S., Siquin, C., Simon, G., Cerantola, S., Riadi, H., Bourgougnon, N. (2011). **Antiviral activities of sulfated polysaccharides isolated from *Sphaerococcus coronopifolius* (Rhodophyta, Gigartinales) and *Boergeseniella thuyoides* (Rhodophyta, Ceramiales).** *Marine Drugs* 9, 1187-1209.
 - Bourgougnon, N., Chermann, J.C., Lahaye, M., Kornprobst, J.M. (1996). **Anti-HIV activity and mode of action *in vitro* of the sulfated polysaccharide from *Schizyemia dubyi* (Rhodophyta).** *Cellular Pharmacology* 3, 104-108.
 - Bourgougnon, N., Fingerman, M., Nagabhushanam, R. (2003). **Anti-HIV compounds from red seaweeds.** En: "Recent Advances in Marine Biotechnology", Ed. Science Publishers, California, USA.
 - Bouschbacher, M., Bomsel, M., Verronese, E., Gofflo, S., Ganor, Y., Dezutter-Dambuyant, C., Valladeau, J. (2008). **Early events in HIV transmission through a human reconstructed vaginal mucosa.** *AIDS* 22, 1257-1266.

- Brandolini, A., Hidalgo, A., Plizzari, L., Erba, D. (2011). **Impact of genetic and environmental factors on einkorn wheat (*Triticum monococcum* L. subsp. *monococcum*) polysaccharides.** *Journal of Cereal Sciences* 53, 65-72.
- Braun, J.M., Ko, H.L., Schierholz, J.M., Beuth, J. (2002). **Standardized mistletoe extract augments immune response and down-regulates local and metastatic tumor growth in murine models.** *Anticancer Research* 22, 4187-4190.
- Braz de Oliveira, A.J., Cordeiro, L.M.C., Correia-Goncalves, R.A., Ceole, L.F., Ueda-Nakamura, T., Lacomini, M. (2013). **Structure and antiviral activity of arabinogalactan with (1 → 6)-β-D-galactan core from *Stevia rebaudiana* leaves.** *Carbohydrate Polymers* 94, 179-184.
- Brock, T.D. (1998). **Biología de los Microorganismos**, Ed. Pearson Prentice Hall, Madrid, España.
- Broder, S. (2010). **Twenty-five years of translational medicine in antiretroviral therapy: promises to keep.** *Science Translational Medicine* 39, 39-72.
- Brouwers, J., Vermeire, K., Grammen, C., Schols, D., Augustijns, P. (2011). **Early identification of availability issues for poorly water-soluble microbicide candidates in biorelevant media: a case study with saquinavir.** *Antiviral Research* 91, 217-223.
- Brummelkamp, T.R., Bernards, R., Agami, R. (2002). **A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells.** *Science* 296, 550-553.
- Bruneton, J. (1999). **Pharmacognosie, Phytochimie et Plantes Medicinales**, 3ª ed., Ed. Technique et Documentation Editions Médicales Internationales, Paris, Francia.
- Buchbinder, S.P., Mehrotra, D.V., Duerr, A., Fitzgerald, D.W., Mogg, R., Li, D., Gilbert, P.B., Lama, J.R., Marmor, M., del Rio, C., Mc-Elrath, M.J., Casimiro, D.R., Gottesdiener, K.M., Chodakewitz, J.A., Corey, L., Robertson, M.N., Team., S.S.P. (2008). **Efficacy assessment of a cell-mediated immunity HIV-1 vaccine (the step study): a double-blind, randomised, placebo-controlled, test-of-concept trial.** *The Lancet* 372 1881-1893
- Burana-Osot, J., Pattanapanyasat, K., Soonthornchareonnon, N., Sukapirom, K. Toida, T. (2010). **Characterisation and immunostimulating activity of polysaccharides from Thai medicinal plants.** *Natural Product Research* 24, 1403-1412.
- Burmester, G, and Pezzutto A.(2003). **Color Atlas of Immunology**
- Bush, L.M., Talledo-Thais, K., Casal-Fernandez, A., Perez, M.T. (2011). **Resistant herpes simplex virus infection and HIV: a potential diagnostic and therapeutic dilemma.** *Labmedicine* 42, 452-457.
- Cabrera, A.L. (1953). **Flora de la Provincia de Jujuy**, Vol IX (Buenos Aires, ACME)
- Cabrera, C., Witvrouw, M., Gutierrez, A., Clotet, B., Kuipers, M.E., Swart, P.J., Meijer, D.K.F., Desmyter, J., de Clercq, E., Este, J.A. (1999). **Resistance of the human immunodeficiency virus to the inhibitory action of negatively charged albumins on virus binding to CD4.** *AIDS Research and Human Retroviruses* 15, 1535-1543.
- Cáceres, A., Figueroa, L., Taracena, A.M., Samayoa, B. (1993). **Plants used in Guatemala for the treatment of respiratory-diseases 2. Evaluation of activity of 16 plants against gram-positive bacteria.** *Journal of Ethnopharmacology* 39, 77-82.
- Calzado-Flores, C., Hurtado-Ramirez, M.B., Flores-Villanueva, Z., Verde-Star, M.J., Segura-Luna, J.J., Lozano-Garza, G., Aguilar-Cuestas, G. (2002). **Preliminary**

- chronic toxicological study of aqueous extract of *Phoradendron tomentosum*.** En: Proceedings of the Forty-Fifth Annual Meeting of the Western Pharmacology Society.
- Campbell, I.K., Roberts, L.J., Wicks, I.P. (2003). **Molecular targets in immune-mediated diseases: the case of tumour necrosis factor and rheumatoid arthritis.** *Immunology and Cell Biology* 81, 354-366.
 - Cañigueral, S., Muller, B.M., Salvia, M.J., Iglesias, J., Franz, G. (1994). **Analysis of hydrosoluble polysaccharides from *Ramonda myconi* leaves.** *Planta Medica* 60, 73-76.
 - Cao, C., Peng, Y., Xu, L., Wang, Y., Yang, J., Xiao, P. (2009). **Two flavonoid dimers from *Sarcandra hainanensis* (Pei) Swamy et Bailey.** *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 57, 743-746.
 - Cardoso, S.M., Silva, A.M.S., Coimbra, M.A. (2002). **Structural characterisation of the olive pomace pectic polysaccharide arabinan side chains.** *Carbohydrate Research* 337, 917-924.
 - Cardozo, F.T.G.S., Larsen, I.V., Carballo, E.V., Jose, G., Stern, R.A., Brummel, R.C., Camelini, C.M., Rossi, M.J., Simoes, C.M.O., Brandt, C.R. (2013). **In vivo anti-herpes simplex virus activity of a sulfated derivative of *Agaricus brasiliensis* mycelial polysaccharide.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 57, 2541-2549.
 - Carlo, T.A., Collazo, J.A., Groom, M.J. (2004). **Influences of fruit diversity and abundance on bird use of two shaded coffee plantations.** *Biotropica* 36, 602-614.
 - Carlos, I.Z., Carli, C.B.A., Maia, D.C.G., Benzatti, F.P., Lopes, F.C.M., Roese, F.M., Watanabe, M., Micheletti, A.C., dos Santos, L.C., Vilegas, W., Honda, N.K. (2009). **Immunostimulatory effects of the phenolic compounds from lichens on nitric oxide and hydrogen peroxide production.** *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 19, 847-852.
 - Caron, M., Besson, G., Etenna, S.L.D., Mints-Ndong, A., Mourtas, S., Radaelli, A., Morghen, C.D.G., Loddo, R., La Colla, P., Antimisari, S.G., Kazanji, M. (2011). **Protective properties of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor (MC1220) incorporated into liposome against intravaginal challenge of *Rhesus macaques* with RT-SHIV.** *Virology* 405, 225-233.
 - Carraminana, J.J., Rota, C., Burillo, J., Herrera, A. (2008). **Antibacterial efficiency of Spanish *Satureja montana* essential oil against *Listeria monocytogenes* among natural flora in minced pork.** *Journal of Food Protection* 71, 502-508.
 - Carter, J.M.G. (1988). **The American mistletoe as an oxytocic and emenagogue.** *Chicago Medical Journal* 56, 336-339.
 - Carter, G.C., Bernstone, L., Sangani, D., Bee, J.W., Harder, T., James, W. (2009). **HIV entry in macrophages is dependent on intact lipid rafts.** *Virology* 386, 192-202.
 - Castroviejo, S., Lainz, M., Lopez-Gonzalez, G., Montserrat, P., Muñoz-Garmendia, F., Paiva, J., Villar, L. (1997). **Flora Ibérica**, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, España.
 - Cerini, F., Landay, A., Gichinga, C., Lederman, M.M., Flyckt, R., Starks, D., Offord, R.E., Le Gal, F., Hartley, O. (2008). **Chemokine analogues show suitable stability for development as microbicides.** *Journal of Acquired Immunodeficiency Syndromes* 49, 472-476.

- Cetojevic-Simin, D.D., Bogdanovic, G.M., Cvetkovic, D.D., Velicanski, A.S. (2008). **Antiproliferative and antimicrobial activity of traditional kombucha and *Satureja montana* L. kombucha.** *Journal of the Balkan Union of Oncology* 13, 395-401.
- Chandrashekar, P.M., Prashanth, K.V.H., Venkatesh, Y.P. (2011). **Isolation, structural elucidation and immunomodulatory activity of fructans from aged garlic extract.** *Phytochemistry* 72, 255-264.
- Chang, F.R., Yang, P.Y., Lin, J.Y., Lee, K.H., Wu, Y.C. (1998). **Bioactive kaurane diterpenoids from *Annona glabra*.** *Journal of Natural Products* 61, 437-439.
- Chang, L., Otero, S., Hooper, J., Bewley, C. (2002). **Batzelline D and isobatzelline E from the indopacific sponge *Zyzya fuliginosa*.** *Journal of Natural Products* 65, 776-778.
- Chang, L., Whittaker, N., Bewley, C. (2003). **Crambescidin 826 and dehydrocrambine A: new polycyclic guanidine alkaloids from the marine sponge *Monanchora* spp. that inhibit HIV-1 fusion.** *Journal of Natural Products* 66, 1490-1494.
- Chang, J.F., Lin, Y.S., Huang, P.L., Lu, S.S. (2009). **A Micromachined V-band CMOS bandpass filter with 2-dB insertion-loss.** *En: 59th Electronic Components and Technology Conference, Vols 1-4*, 1590-1593.
- Chang, S.C., Hsu, B.Y., Chen, B.H. (2010). **Structural characterization of polysaccharides from *Zizyphus jujuba* and evaluation of antioxidant activity.** *International Journal of Biological Macromolecules* 47, 445-453.
- Chang, C.Y., Cheng, T.J., Chang, F.R., Wang, H.Y., Kan, W.C., Li, S.L., Huang, L.H., Chen, Y.C., Tsai, W.C., Huang, C.H., Cheng, C.H., Lee, G.Y., Shyue, S.W., Chen, Y.P., Lin, K.C., Chuu, J.J. (2011). **Macrophage mediated anti-proliferation effects of *Anthodia camphorata* non-polysaccharide based extracts on human hepatoma cells.** *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 75, 624-632.
- Chaplin, M.F., Kennedy, J.F. (1994). **Carbohydrate Analysis. A Practical Approach**, Ed. Oxford University Press, Oxford, U.K.
- Chattopadhyay, N., Ghosh, T., Sinha, S., Chattopadhyay, K., Karmakar, P., Ray, B. (2010). **Polysaccharides from *Turbinaria conoides*: structural features and antioxidant capacity.** *Food Chemistry* 118, 823-829.
- Chen, K., Kashiwada, Y., Zhang, D.C., Hu, C.Q., Jin, J.Q., Nozaki, H., Kilkuskie, R.E., Tramontano, E., Cheng, Y.C., Mc Phail, D.R., Mc Phail, A.T., Lee, K.H., Shi, Q. (1992a). **Anti-AIDS agents 6. Salaspermic acid, an anti-HIV principle from *Tripterygium wilfordii*, and the structure-activity correlation with its related-compounds.** *Journal of Natural Products* 55, 340-346.
- Chen, K., Shi, Q., Fujioka, T., Zhang, D.C., Hu, C.Q., Jin, J.Q., Kilkuskie, R.E., Lee, K.H. (1992b). **Anti-AIDS agents 4. Tripterifordin, a novel anti-HIV principle from *Tripterygium wilfordii*: isolation and structural elucidation.** *Journal of Natural Products* 55, 88-92.
- Chen, K., Shi, Q.A., Fujioka, T., Nakano, T., Hu, C.Q., Jin, J.Q., Kilkuskie, R.E., Lee, K.H. (1995). **Anti-AIDS agents 19. Neotripterifordin, a novel anti-HIV principle from *Tripterygium wilfordii*: isolation and structural elucidation.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 3, 1345-1348
- Chen, D.F., Zhang, S.X., Xie, L., Xie, J.X., Chen, K., Kashiwada, Y., Zhou, B.N., Wang, P., Cosentino, L.M., Lee, K.H. (1997). **Anti-AIDS agents 26. Structure-**

- activity correlations of gomisins-G-related anti-HIV lignans from *Kadsura interior* and of related synthetic analogues.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 5, 1715-1723.
- Chen, I., Kashiwada, Y., Morris, S., Lee, K. (2003). **Plant-derived terpenoids and analogues as anti-HIV agents.** *Current Topics in Medicinal Chemistry* 3, 155-169.
 - Chen, C.C., Liu, Y.W., Ker, Y.B., Wu, Y.Y., Chyau, C.C., Hseu, T.H., Peng, R.Y. (2006a). **Antioxidative and anti-inflammatory activity of polysaccharides fractionated from submerge-cultured *Antrodia camphorata* mycelia.** Proceedings of the XIII Congress of the Society for Free Radical Research International, 91-98.
 - Chen, S.T., Dou, J., Temple, R., Agarwal, R., Wu K.M., Walker, S. (2006b). **New therapies from old medicines.** *Nature Biotechnology* 26, 1077-1083.
 - Chen, C.C., Liu, Y.W., Ker, Y.B., Wu, Y.Y., Lai, E.Y., Chyau, C.C., Hseu, T.H., Peng, R.Y. (2007). **Chemical characterization and anti-inflammatory effect of polysaccharides fractionated from submerge-cultured *Antrodia camphorata* mycelia.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 5007-5012.
 - Chen, J.A., Chen, X., Qin, J.A. (2011a). **Effects of polysaccharides of the *Euphoria longan* (Lour.) Steud on focal cerebral ischemia/reperfusion injury and its underlying mechanism.** *Brain Injury* 25, 292-299.
 - Chen, T., Li, B., Li, Y., Zhao, C.D., Shen, J.M., Zhang, H.X. (2011b). **Catalytic synthesis and antitumour activities of sulfated polysaccharide from *Gynostemma pentaphyllum* Makino.** *Carbohydrate Polymers* 83, 554-560.
 - Cheng, C.L., Ng, K.Y., Xu, H.X. (2011a). **Recent advances in the discovery of novel anti-herpetic agents from Chinese herbal medicines.** *Current Organic Chemistry* 14, 1714-1726.
 - Cheng, D.Y., Liang, B., Li, M.X., Jin, M.L. (2011b). **Influence of *Laminarin* polysaccharides on oxidative damage.** *International Journal of Biological Macromolecules* 48, 63-66.
 - Cheng, H.R., Li, S.S., Fan, Y.Y., Gao, X.G., Hao, M.A., Wang, J., Zhang, X.Y., Tai, G.H., Zhou, Y.F. (2011c). **Comparative studies of the antiproliferative effects of ginseng polysaccharides on HT-29 human colon cancer cells.** *Medical Oncology* 28, 175-181.
 - Chin, L.W., Cheng, Y.W., Lin, S.S., Lai, Y.Y., Lin, L.Y., Chou, M.Y., Chou, M.C., Yang, C.C. (2010). **Anti-herpes simplex virus effects of berberine from *Coptidis rhizoma*, a major component of a Chinese herbal medicine, Ching-Wei-San.** *Archives of Virology* 155, 1933-1941.
 - Chisholm, C., López, L. (2011). **Cutaneous infections caused by Herpesviridae, a review.** *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 135, 1357-1362.
 - Chiu, L.C.M., Zhu, W., Ooi, V.E.C. (2004). **A polysaccharide fraction from medicinal herb *Prunella vulgaris* downregulates the expression of herpes simplex virus antigen in Vero cells.** *Journal of Ethnopharmacology* 93, 63-68.
 - Chlubnova, I., Sylla, B., Nugier-Chauvin, C., Daniellou, R., Legentil, L., Kralova, B., Ferrieres, V. (2011). **Natural glycans and glycoconjugates as immunomodulating agents.** *Natural Product Reports* 28, 937-952.
 - Chrestani, F., Sierakowski, M.R., Uchoa, D.E.D., Nozawa, C., Sassaki, G.L., Gorin, P.A.J., Ono, L. (2009). **In vitro antiherpetic and antirotaviral activities of a sulfate**

- prepared from *Mimosa scabrella* galactomannan. *International Journal of Biological Macromolecules* 45, 453-457.
- Chrpova, D., Kourimska, L., Gordon, M.H., Hermanova, V., Roubickova, I., Panek, J. (2010). **Antioxidant activity of selected phenols and herbs used in diets for medical conditions.** *Czech Journal of Food Sciences* 28, 317-325.
 - Chyau, C., Chen, C., Wu, Y., Liu, Y., Peng, R.Y. (2006). **Antioxidative and anti-inflammatory activity of polysaccharides fractionated from submerge-cultured *Antrodia camphorata* mycelia.** *Free Radical Research* 40, S104.
 - Ciucanu, I., Kerek, F. (1984). **A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates.** *Carbohydrate Research* 131, 209-217.
 - Clark, I., Awburn, M., Whitten, R., Harper, C., Liomba, N., Molyneux, M., Taylor, T. (2003). **Tissue distribution of migration inhibitory factor and inducible nitric oxide synthase in *Falciparum* malaria and sepsis in African children.** *Malarian Journal* 2, 6-23.
 - Cohen, M.S., Chen, Y.Q., Mc Cauley, M., Gamble, T., Hosseinipour, M.C., Kumarasamy, N., Hakim, J.G., Kumwenda, J., Grinsztejn, B., Pilotto, J.H., Godbole, S.V., Mehendale, S., Chariyalertsak, S., Santos, B.R., Mayer, K.H., Hoffman, I.F., Eshleman, S.H., Piwowar-Manning, E., Wang, L., Makhema, J., Mills, L.A., de Bruyn, G., Sanne, I., Eron, J., Gallant, J., Havlir, D., Swindells, S., Ribaud, H., Elharrar, V., Burns, D., Taha, T.E., Nielsen-Saines, K., Celentano, D., Essex, M., Fleming, T.R., Team., H.S. (2011a). **Prevention of HIV-1 infection with early antiretroviral therapy.** *The New England Journal of Medicine* 365, 493-505.
 - Cohen, S., Au, S., Pante, N. (2011b). **How viruses access the nucleus.** *Biochimica et Biophysica Acta Molecular Cell Research* 1813, 1634-1645.
 - Cole, A.M., Patton, D.L., Rohan, L.C., Cole, A.L., Cosgrove-Sweeney, Y., Rogers, N.A., Ratner, D., Sassi, A.B., Lackman-Smith, C., Tarwater, P., Ramratnam, B., Ruchala, P., Lehrer, R.I., Waring, A.J., Gupta, P. (2010). **The formulated microbicide RC-101 was safe and antivirally active following intravaginal application in pigtailed macaques.** *PLoS One* 5, e15111.
 - Collman, R., Balliet, J.W., Gregory, S.A., Friedman, H., Kolson, D.L., Nathanson, N., Srinivasan, A. (1992). **An infectious molecular clone of an unusual macrophage-tropic and highly cytopathic strain of human-immunodeficiency-virus type-1.** *Journal of Virology* 66, 7517-7521.
 - Connor, R.I., Mohri, H., Cao, Y.Z., Ho, D.D. (1993). **Increased viral burden and cytopathicity correlate temporally with CD4+ T-lymphocyte decline and clinical progression in human-immunodeficiency-virus type 1-infected individuals.** *Journal of Virology* 67, 1772-1777.
 - Connor, R.I., Chen, B.K., Choe, S., Landau, N.R. (1995). **VPR is required for efficient replication of human-immunodeficiency-virus type-1 in mononuclear phagocytes.** *Virology* 206, 935-944.
 - Córdoba, E.V., Arnáiz, E., De La Mata, F.J., Gómez, R., Ieal, M., Pion, M., Muñoz-Fernández, M.A. (2013) **Sinergistic activity of carbosilane dendrimers in combination with maviroc against HIV in vitro.** *AIDS* 27(13), 2053-58
 - Correa, J.E. (1994). **Especies Vegetales Promisorias de los Países del Convenio** Andrés Bello, Ed. Guadalupe, Buenos Aires, Argentina.

- Cos, P., Maes, L., Vlietinck, A., Pieters, L. (2008). **Plant-derived leading compounds for chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) infection: an update (1998–2007)**. *Planta Medica* 74, 1323-1337.
- Cottreau, J., Tucker, A., Crutchley, R., Garey, K.W. (2012). **Crofelemer for the treatment of secretory diarrhea**. *Expert Review of Gastroenterology and Hepatology* 6, 17-23.
- Courtemanche, J., Peterson, R.G. (2006). **Beware the mistletoe**. *Canadian Medical Association Journal* 175, 1523-1524.
- Cragg, C., Newman, D.J., Snader, K.M. (1997). **Natural products in drug discovery**. *Journal of Natural Products* 60, 52-60.
- Creagh, T., Ruckle, J.L., Tolbert, D.T., Giltner, J., Eiznhamer, D.A., Dutta, B., Flavin, M.T., Xu, Z.Q. (2001). **Safety and pharmacokinetics of single doses of (+)-calanolide A, a novel naturally occurring non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor, in healthy human immunodeficiency virus-negative human subjects**. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45, 1379-1386.
- Croci, D.O., Cumashi, A., Ushakova, N.A., Preobrazhenskaya, M.E., Piccoli, A., Totani, L., Ustyuzhanina, N.E., Bilan, M.I., Usov, A.I., Grachev, A.A., Morozovich, G.E., Berman, A.E., Sanderson, C.J., Kelly, M., Di Gregorio, P., Rossi, C., Tinari, N., Iacobelli, S., Radinovich, G.A., Nifantiev, N.E., Consorzio Interuniversitario per la Bio-Oncologia (CINBO), Italy (2011). **Fucans, but not fucomannoglucuronans, determine the biological activities of sulfated polysaccharides from *Laminaria saccharina* brown seaweed**. *PLoS One* 6, e17283.
- Cronquist, A. (1981). **An Integrated System of Classification of Flowering Plants**, Ed. Columbia University Press, Columbia, USA.
- Cronquist, A. (1988). **The Evolution and Classification of Flowering Plants**, Ed. Columbia University Press, Columbia, USA.
- Crosby, R.A., Ricks, J., Young, A. (2012). **Condom migration resulting from circumcision, microbicides and vaccines: brief review and methodological considerations**. *Sexual Health* 9, 96-102.
- Cruchaga, C., Anso, E., Font, M., Martino, V., Rouzaut, A., Martinez, J. (2007). **A new strategy to inhibit the excision reaction catalysed by HIV-1 reverse transcriptase: compounds that compete with the template-primer**. *Journal of Biochemistry* 405, 165-171.
- Cruz, G.L. (1995). **Diccionario das Plantas Uteis do Brasil**, Ed. The World Preservation Society, Rio de Janeiro, Brasil.
- Cuatrecasas, J. (1967). **Revisión de las especies colombianas del género *Baccharis***. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales* 13, 5-102.
- Cutler, B., Justman, J. (2008). **Vaginal microbicides and the prevention of HIV transmission**. *The Lancet Infectious Diseases* 8, 685-697.
- D' Cruz, O.J., Qazi, S., Yiv, S., Uckun, F.M. (2012). **A novel vaginal microbicide containing the rationally designed anti-HIV compound HI-443 (N'-[2-(2-thiophene)ethyl]-N'-[2-(5-bromopyridyl)]-thiourea]**. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 21, 265-279.

- Da Poian, A.T., Carneiro, F.A., Stauffer, F. (2009). **Viral inactivation based on inhibition of membrane fusion: understanding the role of histidine protonation to develop new viral vaccines.** *Protein and Peptide Letters* 16, 779-785.
- Dai, J.R., Hallock, Y.F., Cardellina, J.H., Boyd, M.R. (1998). **HIV-inhibitory and cytotoxic oligostilbenes from the leaves of *Hopea malibato*.** *Journal of Natural Products* 61, 351-353.
- Damonte, E.B., Matulewicz, M.C., Cerezo, A.S. (2004). **Sulfated seaweed polysaccharides as antiviral agents.** *Current Medicinal Chemistry* 11, 2399-2419.
- Dang, S.S., Jia, X.L., Song, P., Cheng, Y.A., Zhang, X., Sun, M.Z., Liu, E.Q. (2009). **Inhibitory effect of emodin and *Astragalus* polysaccharide on the replication of HBV.** *World Journal of Gastroenterology* 15, 5669-5673.
- Dardioti, A., Hanlidou, E., Lanaras, T., Kokkini, S. (2010). **The essential oils of the Greek endemic *Satureja horvatii* ssp. *macrophylla* in relation to bioclimate.** *Chemistry and Biodiversity* 7, 1968-1977.
- de Clercq, E. (1995). **Antiviral therapy for human-immunodeficiency-virus infections.** *Clinical Microbiology Reviews* 8, 200-239.
- de Clercq, E. (2001). **Molecular targets for antiviral agents.** *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 297, 1-10.
- de Clercq, E. (2004). **HIV-chemotherapy and prophylaxis: new drugs, leads and approaches.** *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 36, 1800-1822.
- de Clercq, E. (2010a). **Strategies for the treatment of dengue virus infections: a narrative account.** *Future Medicinal Chemistry* 2, 601-608.
- de Clercq, E. (2010b). **Antiretroviral drugs.** *Current Opinion in Pharmacology* 10, 507-515.
- de Cock, K.M., Jaffe, H.W., Curran, J.W. (2012). **The evolving epidemiology of HIV/AIDS.** *AIDS* 26, 1205-1213.
- de Jong, M.A.W.P., de Witte, L., Oudhoff, M.J., Gringhuis, S.I., Gallay, P., Geijtenbeek, T.B.H. (2008). **TNF- α and TLR agonists increase susceptibility to HIV-1 transmission by human Langerhans cells *ex vivo*.** *Journal of Clinical Investigation* 118, 3440-3452.
- de las Heras, B., Slowing, K., Benedi, J., Carretero, E., Ortega, T., Toledo, C., Bermejo, P., Iglesias, I., Abad, M.J., Gomez-Serranillos, P., Liso, P.A., Villar, A., Chiriboga, X. (1998). **Antiinflammatory and antioxidant activity of plants used in traditional medicine in Ecuador.** *Journal of Ethnopharmacology* 61, 161-166.
- de Lucca, D., Zalles, A.J. (1992). **Flora Medicinal Boliviana**, Ed. Los Amigos del Libro, Cochabamba, Bolivia.
- de Oliveira, S.Q., Dal-Pizzol, F., Gosmann, G., Guillaume, D., Moreira, J.C.F., Schenkel, E.P. (2003). **Antioxidant activity of *Baccharis articulata* extracts: isolation of a new compound with antioxidant activity.** *Free Radical Research* 37, 555-559.
- de Oliveira, T.L.C., Soares, R.D., Ramos, E.M., Cardoso, M.D., Alves, E., Piccoli, R.H. (2011). **Antimicrobial activity of *Satureja montana* L. essential oil against *Clostridium perfringens* type A inoculated in mortadella-type sausages formulated with different levels of sodium nitrite.** *International Journal of Food Microbiology* 144, 546-555.

- de Tommasi, N., Desimone, F., Pizza, C., Mahmood, N., Moore, P.S., Conti, C., Orsi, N., Stein, M.L. (1992). **Constituents of *Eriobotrya japonica*: a study of their antiviral properties.** *Journal of Natural Products* 55, 1067-1073.
- del Baño Breis, F. (1990). **Atlas del Polen**, Consejería de Cultura, Educación y Turismo de la Comunidad Autónoma de Murcia, Murcia, España.
- Dell' Agli, M., Sanna, C., Rubiolo, P., Basilico, N., Colombo, E., Scaltrito, M.M., Ndiath, M.O., Maccarone, L., Taramelli, D., Bicchi, C., Ballero, M., Bosisio, E. (2012). **Anti-plasmodial and insecticidal activities of the essential oils of aromatic plants growing in the Mediterranean area.** *Malaria Journal* 11, 219-229.
- Deng, G., Kurtz, R.C., Vickers, A., Laud, N., Yeung, K.S., Shia, J., Cassileth, B. (2011). **A single arm phase II study of a Far-Eastern traditional herbal formulation (Sho-Sai-Ko-To or Xiao-Chai-Hu-Tang) in chronic hepatitis C patients.** *Journal of Ethnopharmacology* 136, 83-87.
- Dergunova, M.A., Alexeenko, T.V., Zhanaeva, S.Y., Filyushina, E.E., Buzueva, I.I., Kolesnikova, O.P., Kogan, G., Korolenko, T.A. (2009). **Characterization of the novel chemically modified fungal polysaccharides as the macrophage stimulators.** *International Immunopharmacology* 9, 729-733.
- Desmachelier, C., Novoa-Bermudez, M.J., Coussio, J., Ciccía, G., Boveris, A. (1997). **Antioxidant and prooxidant activities in aqueous extracts of Argentine plants.** *Journal of Ethnopharmacology* 35, 116-120.
- Dey, P.M. (1990). **Methods in Plant Biochemistry**, Ed. Academic Press, London, U.K.
- Dharmaratne, H., Tan, G., Marasinghe, G., Pezzuto, J. (2002). **Inhibition of HIV-1 reverse transcriptase and HIV-1 replication by *Calophyllum* coumarins and xanthenes.** *Planta Medica* 68, 86-87.
- Di Gianvincenzo, P., Marradi, M., Martinez-Avila, O.M., Bedoya, L.M., Alcamí, J., Penadés, S. (2010). **Gold nanoparticles capped with sulfate-ended ligands as anti-HIV agents.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 20, 2718-2721.
- Dias, K.S., Almeida, D.S., Silva, A.B.L., Marques, M.S., Menezes, I.A.C., Santos, T.C., Maello, I.C.M., Carvalho, A.C.S., Antoniolli, A.R. (2007). **Avaliação dos efeitos miorelaxante, antiespasmódico, antinociceptivo do extrato aquoso da *Phoradendron piperoides* (Künt.) Trel. (Viscaceae).** *Revista Brasileira de Farmacognosia* 17, 373-377.
- Díaz-Ramón, J., Díaz-Pérez, J. (2008). **Herpes simplex and zoster.** *European Journal of Dermatology* 18, 108-111.
- Dinarello, C., Moldawer, L. (1999). **Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis: a primer for clinicians.** Thousand Oaks, CA, USA: Amgen Inc.
- Djenane, D., Yanguela, J., Amrouche, T., Boubrit, S., Boussad, N., Roncales, P. (2011a). **Chemical composition and antimicrobial effects of essential oils of *Eucalyptus globulus*, *Myrtus communis* and *Satureja hortensis* against *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* in minced beef.** *Food Science and Technology International* 17, 505-515.
- Djenane, D., Yanguela, J., Montanes, L., Djerbal, M., Roncales, P. (2011b). **Antimicrobial activity of *Pistacia lentiscus* and *Satureja montana* essential oils**

- against *Listeria monocytogenes* CECT 935 using laboratory media: efficacy and synergistic potential in minced beef. *Food Control* 22, 1046-1053.
- do Rosario, M.M.T., Kangussu-Marcolino, M.M., do Amaral, A.E., Noletto, G.R., Petkowicz, C.L.D. (2011). **Storage xyloglucans: potent macrophages activators.** *Chemico-Biological Interactions* 189, 127-133.
 - Dockal, M., Knappe, S., Panholzer, E., Palige, M., Ehrlich, H., Scheifflinger, F. (2010). **Procoagulant activity of sulfated polysaccharides.** *Haemophilia* 16, 110-111.
 - Dong, C.X., Hayashi, K., Lee, J.B., Hayashi, T. (2010). **Characterization of structures and antiviral effects of polysaccharides from *Portulaca oleracea* L.** *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 58, 507-510.
 - Dong, C.X., Hayashi, K., Mizukoshi, Y., Lee, J.B., Hayashi, T. (2011). **Structures and anti-HSV-2 activities of neutral polysaccharides from an edible plant *Basella rubra* L.** *International Journal of Biological Macromolecules* 50, 245-249.
 - Dong, C.X., Hayashi, K., Mizukoshi, Y., Lee, J.B., Hayashi, T. (2012). **Structures of acidic polysaccharides from *Basella rubra* L. and their antiviral effects.** *Carbohydrate Polymers* 84, 1084-1092.
 - Donia, M., McCubrey, J.A., Bendtzen, K., Nicoletti, F. (2010). **Potential use of rapamycin in HIV infection.** *British Journal of Clinical Pharmacology* 70, 784-793.
 - Dorland, W.A.N. (1999). **Diccionario Médico**, Ed. Mc Graw-Hill Interamericana, Madrid, España.
 - Dorman, H.J.D., Bachmayer, O., Kosar, M., Hiltunen, R. (2004). **Antioxidant properties of aqueous extracts from selected Lamiaceae species grown in Turkey.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 762-770.
 - Dosekun, O., Fox, J. (2011). **An overview of the relative risks of different sexual behaviours on HIV transmission.** *Current Opinion in HIV and AIDS* 5, 291-297.
 - Dourado, F., Cardoso, S.M., Silva, A.M.S., Gama, F.M., Coimbra, M.A. (2006). **NMR structural elucidation of the arabinan from *Prunus dulcis* immunobiological active pectic polysaccharides.** *Carbohydrate Polymers* 66, 27-33.
 - Driouich, A., Follet-Gueye, M.L., Bernard, S., Kousar, S., Chevalier, L., Vicre-Gibouin, M., Lerouxel, O. (2012). **Golgi-mediated synthesis and secretion of matrix polysaccharides of the primary cell wall of higher plants.** *Frontiers in Plant Science* 3, 79.
 - Dropulic, L.K., Cohen, J.I. (2011). **Severe viral infections and primary immunodeficiencies.** *Clinical Infectious Diseases* 53, 897-909.
 - Du, X.J., Zhang, J.S., Yang, Y., Ye, L.B., Tang, Q.J., Jia, W., Liu, Y.F., Zhou, S., Hao, R.X., Gong, C.Y., Pan, Y.J. (2009). **Structural elucidation and immuno-stimulating activity of an acidic heteropolysaccharide (TAPA1) from *Tremella aurantialba*.** *Carbohydrate Research* 344, 672-678.
 - Du, T., Hu, K., Yang, J., Jin, J., Li, C., Stieh, D., Griffin, G.E., Shattock, R.J., Hu, Q. (2012). **Bifunctional CD4-DC-SIGN fusion proteins demonstrate enhanced avidity to gp120 and inhibit HIV-1 infection and dissemination.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56, 4640-4649.
 - Duan, J.Y., Chen, V.L., Dong, Q., Ding, K., Fang, J.I.A. (2010). **Chemical structure and immunoinhibitory activity of a pectic polysaccharide containing glucuronic acid from the leaves of *Diospyros kaki*.** *International Journal of Biological Macromolecules* 46, 465-470.

-
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F. (1956). **Colorimetric method for determination of sugars and related substances.** *Analytical Chemistry* 28, 350-356.
 - Duke, J.A. (1992). **Handbook of Phytochemical Constituents of Grass, Herbs and other Economic Plants**, Ed. C.R.C. Press, Florida, USA.
 - Dulger, B., Hacıoglu, N. (2008). **Antifungal activity of endemic *Satureja icarica*.** *Asian Journal of Chemistry* 20, 6505-6508.
 - Dunkic, V., Bezic, N., Vuko, E., Cukrov, D. (2010). **Antiphytoviral activity of *Satureja montana* L. ssp *variegata* (Host) P. W. Ball essential oil and phenol compounds on CMV and TMV.** *Molecules* 15, 6713-6721.
 - Durantel, D. (2009). **Celgosivir, an α -glucosidase I inhibitor for the potential treatment of HCV infection.** *Current Opinion in Investigational Drugs* 10, 860-870.
 - Duus, J.O., Gottfredsen, C.H., Bock, K. (2000). **Carbohydrate structural determination by NMR spectroscopy: modern methods and limitations.** *Chemical Reviews* 100, 4589-4614.
 - Eftekhari, F., Raei, F., Yousefzadi, M., Ebrahimi, S.N., Hadian, J. (2009). **Antibacterial activity and essential oil composition of *Satureja spicigera* from Iran.** *Zeitschrift Fur Naturforschung Section C* 64, 20-24.
 - Eiznhamer, D.A., Creagh, T., Ruckle, J.L., Tolbert, D.T., Giltner, J., Dutta, B., Flavin, M.T., Jenta, T., Xu, Z.Q. (2002). **Safety and pharmacokinetic profile of multiple escalating doses of (+)-calanolide A, a naturally occurring non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor, in healthy HIV-negative volunteers.** *HIV Clinical Trials* 3, 435-450.
 - Elinov, N.P., Gurina, S.V., Ananeva, E.P. (1995). **Immunobiological activity of yeasts glicanes in the experiment.** *Mikologiya I Fitopatologiya* 29, 39-43.
 - Endo, Y., Oka, T., Tsurugi, K., Franz, H. (1989). **The mechanism of action of the cytotoxic lectin from *Phoradendron californicum*: the RNA N-glycosidase activity of the protein.** *FEBS Letters* 248, 115-118.
 - Engelman, A., Cherepanov, P. (2012). **The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights.** *Nature Reviews Microbiology* 10, 279-290.
 - Erdelmeier, C.A., Cinatl, J.J., Rabenan, H., Doerr, H.W., Biber, A., Koch, E. (1996). **Antiviral and antiflogistic activities of *Hammamelis virginiana* bark.** *Planta Medica* 62, 241-245.
 - Esplugues, J.V., Barrachina, M.D. (2009). **Mediadores Celulares II. Eicosanoides, Óxido Nítrico y Factor Activador de Plaquetas**, En: "Farmacología Humana", Ed. Masson, Barcelona, España.
 - Esquivel, M.M., Ribeiro, M.A., Bernardo-Gil, M.G. (1999). **Supercritical extraction of savory oil: study of antioxidant activity and extract characterization.** *Journal of Supercritical Fluids* 14, 129-138.
 - Este, J.A., Telenti, A. (2007). **HIV entry inhibitors.** *The Lancet* 370, 81-88.
 - Esteves, A.I.S., Nicolai, M., Humanes, M., Goncalves, J. (2011). **Sulfated polysaccharides in marine sponges: extraction methods and anti-HIV activity.** *Marine Drugs* 9, 139-153.
 - Ettehadi, P., Greaves, M.W., Wallach, D., Aderka, D., Camp, R.D.R. (1994). **Elevated tumor-necrosis-factor- α (TNF- α) biological activity in psoriatic skin lesions.** *Clinical and Experimental Immunology* 96, 146-151.
-

- Exarchou, V., Nenadis, N., Tsimidou, M., Gerothanassis, I.P., Troganis, A., Boskou, D. (2002). **Antioxidant activities and phenolic composition of extracts from Greek oregano, Greek sage, and summer savory.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 5294-5299.
- Eyngor, M., Tekoah, Y., Shapira, R., Hurvitz, A., Zlotkin, A., Lublin, A., Eldar, A. (2008). **Emergence of novel *Streptococcus iniae* exopolysaccharide-producing strains following vaccination with nonproducing strains.** *Applied and Environmental Microbiology* 74, 6892-6897.
- Faccin-Galhardi, L.C., Yamamoto, K.A., Ray, S., Ray, B., Nozawa, C. (2012). **The *in vitro* antiviral property of *Azadirachta indica* polysaccharides for poliovirus.** *Journal of Ethnopharmacology* 142, 86-90.
- Fahey, J.V., Schaefer, T.M., Wira, C.R. (2006). **Sex hormone modulation in human uterine epithelial cell immune responses.** *Integrative and Comparative Biology* 46, 1082-1087.
- Fahn, A. (1978). **Anatomía Vegetal**, Ed. H. Blume, Barcelona, España.
- Fan, X.N., Lin, S., Zhu, C.G., Yang, Y.C., Shi, J.G. (2010). **Minor new constituents from *Heteroplexis micocephala* Yao Xue Xue Bao.** *Acta Pharmaceutica Sinica* 45, 82-86.
- Fauci, A., Braunwald, E., Kasper, D., Hauser, S., Longo, D., Jameson, J., Loscalzo, J. (2012). **Harrison Principios de Medicina Interna**, 18ª ed., Ed. Mc Graw Hill Interamericana, México D.F., México.
- Federspiel, B., Melhado, I.G., Duncan, A.M.V., Delaney, A., Schappert, K., Clarklewis, I., Jirik, F.R. (1993). **Molecular-cloning of the c-DNA and chromosomal localization of the gene for a putative 7-transmembrane segment (7-TMS) receptor isolated from human spleen.** *Genomics* 16, 707-712.
- Feliciano, A.S., Gordaliza, M., del Corral, J.M.M., Castro, M.A., Garcia-Gravalos, M.D., Ruiz-Lázaro, P. (1993). **Antineoplastic and antiviral activities of some cyclolignans.** *Planta Medica* 59, 246-249.
- Fen, L., Liu, Y.H., Meng, Y.W., Min, Y., He, K.Z. (2004). **Structure of polysaccharide from *Polygonatum cyrtoneura* Hua and the antiherpetic activity of its hydrolyzed fragments.** *Antiviral Research* 63, 183-189.
- Fenyo, E.M., Morfeldtmanson, L., Chiodi, F., Lind, B., Vongegerfelt, A., Albert, J., Olausson, E., Asjo, B. (1988). **Distinct replicative and cytopathic characteristics of human immunodeficiency virus isolates.** *Journal of Virology* 62, 4414-4419.
- Fernandez-Romero, J.A., Thorn, M., Turville, S.G., Titchen, K., Sudol, K., Li, J., Miller, T., Robbiani, M., Maguire, R.A., Buckheit, R.W., Hartman, T.L., Phillips, D.M. (2007). **Carrageenan/MIV-150 (PC-815), a combination microbicide.** *Sexually Transmitted Diseases* 34, 9-14.
- Ferreres, F., Tomas-Barberán, F.A., Tomas, F. (1987). **Free flavone aglycones and flavonoid glycosides from *Satureja obovata*.** *International Journal of Crude Drug Research* 25, 246-250.
- Fessel, W.J., Anderson, B., Follansbee, S.E., Winters, M.A., Lewis, S.T., Weinheimer, S.P., Petropoulos, C.J., Shafer, R.W. (2011). **The efficacy of an anti-CD4 monoclonal antibody for HIV-1 treatment.** *Antiviral Research* 92, 484-487.
- Flekhter, O., Boreko, E., Nigmatullina, L., Pavlova, N., Medvedeva, N., Nikolaeva, S., Ashavina, O., Savinova, O., Baltina, L., Galin, F., Tolstikov, G. (2004). **Synthesis and**

- antiviral activity of lupane triterpenoids and their derivatives.** *Pharmaceutical Chemistry Journal* 38, 355-358.
- Fletcher, P.S., Elliott, J., Margolis, L., Antón, P., Mc Gowan, I., Shattock, R.J. (2006a). **Ex vivo culture of human colorectal tissue for the evaluation of candidate microbicides.** *AIDS* 20, 1237-1245.
 - Fletcher, P.S., Wallace, G.S., Mesquita, P.M.M., Shattock, R.J. (2006b). **Candidate polyanion microbicides inhibit HIV-1 infection and dissemination pathways in human cervical explants.** *Retrovirology* 3, 46-58.
 - Fletcher, P.S., Shattock, R.J. (2008). **PRO-2000, an antimicrobial gel for the potential prevention of HIV infection.** *Current Opinion in Investigational Drugs* 9, 189-200.
 - Fletcher, P.S., Harman, S., Azijn, H., Armanasco, N., Manlow, P., Perumal, D., de Bethune, M.P., Nuttall, J., Romano, J., Shattock, R. (2009). **Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 infection by the candidate microbicide dapivirine, a non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53, 487-495.
 - Florez, J. (2008). **Farmacología Humana**, 5ª ed, Ed. Elsevier-Masson, Barcelona, España.
 - Font Quer, P. (1995). **Diccionario de Botánica y Plantas Medicinales, El Dioscórides Renovado**, Ed. Labor, Barcelona, España.
 - Fournet, A., Barrios, A.A., Muñoz, V. (1994). **Leishmanicidal and trypanocidal activities of Bolivian medicinal plants.** *Journal of Ethnopharmacology* 41, 19-37.
 - Franquemont, C.H., Franquemont, E. (1990). **"Satureja boliviana". The ethnobotany of chinchero and Andean community in Southern Peru.** *Fieldiana Botany* 24, 79.
 - Frater, J. (2011). **New approaches in HIV eradication research.** *Current Opinion in Infectious Diseases* 24, 593-598.
 - Friend, D.R., Kiser, P.F. (2013). **Assessment of topical microbicides to prevent HIV-1 transmission: concepts, testing, lessons learned.** *Antiviral Research* 99, 391-400.
 - Fujioka, T., Kashiwada, Y., Kilkuskie, R.E., Cosentino, L.M., Ballas, L.M., Jiang, J.B., Janzen, W.P., Chen, I.S., Lee, K.H. (1994). **Anti-AIDS agents 11. Betulinic acid and platanic acid as anti-HIV principles from *Syzygium claviflorum*, and the anti-HIV activity of structurally related triterpenoids.** *Journal of Natural Products* 57, 243-247.
 - Fujiwara, M., Ijichi, K., Tokuhisa, K., Katsuura, K., Shigeta, S., Konno, K., Wang, G., Uemura, D., Yokota, T., Baba, M. (1996a). **Mechanism of selective inhibition of human immunodeficiency virus by ingenol triacetate.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 40, 271-273.
 - Fujiwara, M., Ijichi, K., Tokuhisa, K., Katsuura, K., Wang, G., Uemura, D., Shigeta, S., Konno, K., Yokota, T., Baba, M. (1996b). **Ingenol derivatives are highly potent and selective inhibitors of HIV replication in vitro.** *Antiviral Chemistry & Chemotherapy* 39, 230-236.
 - Fullas, F., Hussain, R.A., Chai, H.B., Pezzuto, J.M., Soejarto, D.D., Kinghorn, A.D. (1994). **Cytotoxic constituents of *Baccharis gaudichaudiana*.** *Journal of Natural Products* 57, 801-807.

- Galvez, J., Gracioso, J.D., Camuesco, D., Vilegas, W., Brito, A., Zarzuelo, A. (2006). **Intestinal antiinflammatory activity of a lyophilized infusion of *Turnera ulmifolia* in TNBS rat colitis.** *Fitoterapia* 77, 515-520.
- Gamal-Eldeen, A.M., Ahmed, E.F., Abo-Zeid, M.A. (2009). ***In vitro* cancer chemopreventive properties of polysaccharide extract from the brown alga *Sargassum latifolium*.** *Food and Chemical Toxicology* 47, 1378-1384.
- Gan, D., Ma, L.P., Jiang, C.X., Xu, R.J., Zeng, X.X. (2010). **Production, preliminary characterization and antitumour activity *in vitro* of polysaccharides from the mycelium of *Pholiota dinghuensis* Bi.** *Carbohydrate Polymers* 84, 997-1003.
- Garcia, C., Rosso, M., Bertoni, M., Maier, M., Damonte, E. (2002). **Evaluation of the antiviral against Junin virus of macrocyclic trichothecenes produced by the hypocrealean epibiont of *Baccharis coridifolia*.** *Planta Medica* 68, 209–212.
- Garcia-Perez, J., Sanchez-Palomino, S., Perez-Olmeda, M., Fernandez, B., Alcami, J. (2007). **A new strategy based on recombinant viruses as a tool for assessing drug susceptibility of human immunodeficiency virus type 1.** *Journal of Medical Virology* 79, 127-137.
- Garcia-Perez, J., Rueda, P., Staropoli, I., Kellenberger, E., Alcami, J., Arenzana-Seisdedos, F., Lagane, B. (2011). **New insights into the mechanisms whereby low molecular weight CCR5 ligands inhibit HIV-1 infection.** *Journal of Biological Chemistry* 286, 4978-4990.
- Garg, S., Goldman, D., Krumme, M., Rohan, L.C., Smoot, S., Friend, D.R. (2010). **Advances in development, scale-up and manufacturing of microbicide gels, films and tablets.** *Antiviral Research* 88, S19-S29.
- Gatell, J., Clotet, B., Podzamczar, D., Miró, J., Mallolas, J. (2011). **Guía Práctica del SIDA: Clínica, Diagnóstico y Tratamiento**, Ed. Antares, Barcelona, España.
- Ge, Q., Zhang, A.Q., Sun, P.L. (2010). **Isolation, purification and structural characterization of a novel water-soluble glucan from the fruiting bodies of *Phellinus baumii* Pilat.** *Journal of Food Biochemistry* 34, 1205-1215.
- Geisbert, T.W., Feldmann, H. (2011). **Recombinant vesicular stomatitis virus-based vaccines against Ebola and Marburg virus infections.** *Journal of Infectious Diseases* 204, S1075-S1081.
- Gene, R.M., Marin, E., Adzet, T. (1992). **Antiinflammatory effect of aqueous extracts of three species of the genus *Baccharis*.** *Planta Medica* 58, 565-566.
- Gene, R.M., Cartana, C., Adzet, T., Mann, E., Parella, T., Cañigueral, S. (1996). **Anti-inflammatory and analgesic activity of *Baccharis trimera*: identification of its active constituents.** *Planta Medica* 62, 232-235.
- Gengiah, T.N., Moosa, A., Naidoo, A., Mansoor, L.E. (2014). **Adherence challenges with drugs for pre-exposure prophylaxis to prevent HIV infection.** *International Journal of Clinical Pharmacy* 36, 70-85.
- Gerencer, M., Turecek, P.L., Kistner, O., Mitterer, A., Savidis-Dacho, H., Barrett, N.P. (2006). ***In vitro* and *in vivo* anti-retroviral activity of the substance purified from the aqueous extract of *Chelidonium majus* L.** *Antiviral Research* 72, 153-156.
- Gerwig, G.J., Kamerling, J.P., Vliegenthart, J.F.G. (1979). **Determination of the absolute configuration of monosaccharides in complex carbohydrates by capillary GLC.** *Carbohydrate Research* 77, 1-7.

- Ghasemmi-Pirbalouti, A., Jahanbaci, P., Enteshari, F., Malekpoor, F., Hamed, B. (2010). **Antimicrobial activity of some Iranian medicinal plants.** *Archive of Biological Sciences* 62, 633-642.
- Ghasemi-Pirbalouti, A., Nikobin-Broujeni, V., Momeni, M., Malek-Poor, F., Hanmedi, B. (2011). **Antibacterial activity of Iranian medicinal plants against *Streptococcus iniae* isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).** *Archive of Biological Sciences* 63, 59-66.
- Ghazanfari, G., Minaie, B., Yasa, N., Nakhai, L.A., Mohammadirad, A., Nikfar, S., Dehghan, G., Boushehri, V.S., Jamshidi, H., Khorasani, R., Salehnia, A., Abdollahi, M. (2006). **Biochemical and histopathological evidences for beneficial effects of *Satureja khuzestanica* Jamzad essential oil on the mouse model of inflammatory bowel diseases.** *Toxicology Mechanisms and Methods* 16, 365-372.
- Ghosh, T., Chattopadhyay, K., Marschall, M., Karmakar, P., Mandal, P., Ray, B. (2009). **Focus on antivirally active sulfated polysaccharides: from structure-activity analysis to clinical evaluation.** *Glycobiology* 19, 2-15.
- Giao, M.S., Leitao, I., Pereira, A., Borges, A.B., Guedes, C.J., Fernandes, J.C., Belo, L., Santos-Silva, A., Hogg, T.A., Pintado, M.E., Malcata, X. (2009). **Plant aqueous extracts: antioxidant capacity via haemolysis and bacteriophage P22 protection.** *Food Control* 21, 633-638.
- Gibson, R.M., Arts, E.J. (2012). **Past, present, and future of entry inhibitors as HIV microbicides.** *Current HIV Research* 10, 19-26.
- Girault, L. (1987). **Kalawayá: Curanderos Itinerantes de los Andes. Investigación sobre Prácticas Medicinales y Mágicas**, Ed. UNICEF-OPS-OMS, La Paz, Bolivia.
- Giweli, A., Dzamic, A.M., Sokovic, M., Ristic, M.S., Marin, P.D. (2012). **Antimicrobial and antioxidant activities of essential oils of *Satureja thymbra* growing wild in Libya.** *Molecules* 17, 4836-4850.
- Gohari, A.R., Saeidnia, S., Gohari, M.R., Moradi-Afrapoli, F., Malmir, M., Hadjiakhoondi, A. (2009). **Bioactive flavonoids from *Satureja atropatana* Bonge.** *Natural Product Research* 23, 1609-1614.
- Gohari, A.R., Ostad, S.N., Moradi-Afrapoli, F., Malmir, M., Tavajohi, S., Akbari, H., Saeidnia, S. (2012). **Evaluation of the cytotoxicity of *Satureja spicigera* and its main compounds.** *The Scientific World Journal* 12, 1-5.
- Gómez-Sánchez, M., Sánchez-Fuentes, L.J., Salazar-Olivo, L.A. (2011). **Anatomy of Mexican species of the genera *Phoradendron* and *Psittacanthus*, endemic to the New World.** *Revista Mexicana de Biodiversidad* 82, 4.
- Gonzales, E., Iglesias, I., Carretero, E., Villar, A. (2000). **Gastric cytoprotection of Bolivian medicinal plants.** *Journal of Ethnopharmacology* 70, 329-333.
- Gonzalez-Lopez, B.S., Yamamoto, M., Utsumi, K., Aratsu, C., Sakagami, H. (2009). **A clinical pilot study of lignin-ascorbic acid combination treatment of herpes simplex virus.** *In Vivo* 23, 1011-1016.
- González, N., Bermejo, M., Jolly, C., Arenzana-Seisdedos, F., Pablos, J.L., Sattentau, Q.J., Alcamí, J. (2010a). **SDF-1/CXCL12 production by mature dendritic cells inhibits the propagation of X4-tropic HIV-1 isolates at the dendritic cell-T-cell infectious synapse.** *Journal of Virology* 84, 4341-4351.
- González, N., Pérez-Olmeda, M., Mateos, E., Cascajero, A., Alvarez, A., Spijkers, S., García-Pérez, J., Sánchez-Palomino, S., Ruiz-Mateos, E., Leal, M., Alcamí, J.

- (2010b). **A sensitive phenotypic assay for the determination of human immunodeficiency virus type 1 tropism.** *Journal of Antimicrobial and Chemotherapy* 65, 2493-2501.
- Goren, A.C., Topcu, G., Bilsel, G., Bilsel, M., Wilkinson, J.M., Cavanagh, H.M.A. (2004). **Analysis of essential oil of *Satureja thymbra* by hydrodistillation, thermal desorber, and headspace GC/MS techniques and its antimicrobial activity.** *Natural Product Research* 18, 189-195.
 - Grammen, C., Arien, K.K., Venkatraj, M., Joossens, J., Van der Veken, P., Heeres, J., Lewi, P.J., Haenen, S., Augustyns, K., Vanham, G., Augustijns, P., Brouwers, J. (2014). **Development and *in vitro* evaluation of a vaginal microbicide gel formulation for UAMC01398, a novel diarylthiazine NNRTI against HIV-1.** *Antiviral Research* 101, 113-121.
 - Grant, R.M., Lama, J.R., Anderson, P.L., Mc Mahan, V., Liu, A.Y., Vargas, L., Goicochea, P., Casapía, M., Guanira-Carranza, J.V., Ramirez-Cardich, M.E., Montoya-Herrera, O., Fernández, T., Veloso, V.G., Buchbinder, S.P., Chariyalertsak, S., Schechter, M., Bekker, L.G., Mayer, K.H., Kallás, E.G., Amico, K.R., Mulligan, K., Bushman, L.R., Hance, R.J., Ganoza, C., Defechereux, P., Postle, B., Wang, F., Mc Connell, J.J., Zheng, J.H., Lee, J., Rooney, J.F., Jaffe, H.S., Martinez, A., Burns, D.N., Glidden, D.V., Team, I.S. (2010). **Pre-exposure chemoprophylaxis for HIV prevention in men who have sex with men.** *The New England Journal of Medicine* 363, 2587-2599.
 - Greene, W.C. (1991). **Mechanisms of disease: the molecular-biology of human immunodeficiency virus type-1 infection.** *The New England Journal of Medicine* 324, 308-317.
 - Gronhaug, T.E., Ghildyal, P., Barsett, H., Michaelsen, T.E., Morris, G., Diallo, D., Inngjerdengen, M., Paulsen, B.S. (2010). **Bioactive arabinogalactans from the leaves of *Opilia celtidifolia* Endl. ex Walp. (Opiliaceae).** *Glycobiology* 20, 1654-1664.
 - Grosso, C., Coelho, J.A., Urieta, J.S., Palavra, A.M.F., Barroso, J.G. (2010). **Herbicidal activity of volatiles from coriander, winter savory, cotton lavender and thyme isolated by hydrodistillation and supercritical fluid extraction.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 11007-11013.
 - Grunewald, N., Alban, S. (2009). **Optimized and standardized isolation and structural characterization of anti-inflammatory sulfated polysaccharides from the red alga *Delesseria sanguinea* (Hudson) *lamouroux* (Ceramiales, Delesseriaceae).** *Biomacromolecules* 10, 2998-3008.
 - Grunewald, N., Groth, I., Alban, S. (2009). **Evaluation of seasonal variations of the structure and anti-inflammatory activity of sulfated polysaccharides extracted from the red alga *Delesseria sanguinea* (Hudson) *lamouroux* (Ceramiales, Delesseriaceae).** *Biomacromolecules* 10, 1155-1162.
 - Guan, D., Zhang, Z.Y., Yang, Y.N., Sugiura, N., Hu, H.H., Xing, G.Q., Liu, J.Q., Zu, X.Y., Zhang, Y. (2011). **Antioxidant and antitumour activities of water extracts from the root of *Actinidia kolomikta*.** *Experimental and Therapeutic Medicine* 2, 33-39.

- Gumus, T. (2010). **Determination of the changes of antifungal properties of *Satureja hortensis*, *Thymus vulgaris* and *Thymbra spicata* exposed to γ irradiation.** *Radiation Physics and Chemistry* 79, 109-114.
- Guo, Q., Ho, H.T., Dicker, I., Fan, L., Zhou, N.N., Friborg, J., Wang, T., Mc Auliffe, B.V., Wang, H.G.H., Rose, R.E., Fang, H., Scarnati, H.T., Langley, D.R., Meanwell, N.A., Abraham, R., Colonna, R.J., Lin, P.F. (2003). **Biochemical and genetic characterizations of a novel human immunodeficiency virus type 1 inhibitor that blocks gp120-CD4 interactions.** *Journal of Virology* 77, 10528-10536.
- Gupta, M. (1995). **270 Plantas Medicinales Iberoamericanas**, Ed. Convenio Andres Bello, Buenos Aires, Argentina.
- Gursoy, U.K., Gursoy, M., Gursoy, O.V., Cakmakci, L., Kononen, E., Uitto, V.J. (2009). **Anti-biofilm properties of *Satureja hortensis* L. essential oil against periodontal pathogens.** *Anaerobe* 15, 164-167.
- Gutierrez, M., Lopez, S. (2010). **Mechanisms of virus entry: a way to learn about the host cell.** *TIP Revista Especializada en Ciencias Quimico-Biologicas* 13, 26-34.
- Gutierrez, R.M.P., Navarro, Y.T.G. (2010). **Antioxidant and hepatoprotective effects of the methanol extract of the leaves of *Satureja macrostema*.** *Pharmacognosy Magazine* 6, 125-131..
- Ha, M.A., Vietor, R.J., Jardine, G.D., Apperley, D.C., Jarvis, M.C. (2005). **Conformation and mobility of the arabinan and galactan side-chains of pectin.** *Phytochemistry* 66, 1817-1824.
- Haase, A.T. (2010). **Targeting early infection to prevent HIV-1 mucosal transmission.** *Nature* 464, 217-223.
- Haase, A.T. (2011). **Early events in sexual transmission of HIV and SIV and opportunities for interventions.** *Annual Review of Medicine* 62, 127-139.
- Habibi, Y., Mahrouz, M., Vignon, M.R. (2005). **Arabinan-rich polysaccharides isolated and characterized from the endosperm of the seed of *Opuntia ficus-indica* prickly pear fruits.** *Carbohydrate Polymers* 60, 319-329.
- Hadian, J., Mirjalili, M.H., Kanani, M.R., Salehnia, A., Ganjipoor, P. (2011). **Phytochemical and morphological characterization of *Satureja khuzistanica* JAMZAD populations from Iran.** *Chemistry & Biodiversity* 8, 902-915.
- Hadian, J., Akramian, M., Heydari, H., Mumivand, H., Asghari, B. (2012). **Composition and *in vitro* antibacterial activity of essential oils from four *Satureja* species growing in Iran.** *Natural Product Research* 26, 98-108.
- Haineault, C., Gourde, P., Perron, S., Desormeaux, A., Piret, J., Omar, R.F., Tremblay, R.R., Bergeron, M.G. (2003). **Thermoreversible gel formulation containing sodium lauryl sulfate as a potential contraceptive device.** *Biology of Reproduction* 69, 687-694.
- Hajhashemi, V., Zolfaghari, B., Yousefi, A. (2012). **Antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Satureja hortensis* seed essential oil, hydroalcoholic and polyphenolic extracts in animal models.** *Medical Principles and Practice* 21, 178-182.
- Hakomori, S.I. (1964). **A rapid permethylation of glycolipid and polysaccharide catalysed by methylsulfinyl carbanion in dimethylsulfoxide.** *Journal of Biochemistry* 55, 205-208.

- Haladova, E., Mojzisova, J., Smrco, P., Ondrejko, A., Vojtek, B., Prokes, M., Petrovova, E. (2011). **Immunomodulatory effect of glucan on specific and nonspecific immunity after vaccination in puppies.** *Acta Veterinaria Hungarica* 59, 77-86.
- Halliday, S., Lackman-Smith, C., Bader, J.P., Rice, W.G., Clanton, D.J., Zalkow, L.H., Buckheit Jr., R.W. (1996). **Inhibition of human virus replication by the sulfonated stilbene dye resobene.** *Antiviral Research* 33, 41-53.
- Han, H., Chen, Y., Bi, H.T., Yu, L., Sun, C.X., Li, S.S., Oumar, S.A., Zhou, Y.F. (2011). **In vivo antimalarial activity of ginseng extracts.** *Pharmaceutical Biology* 49, 283-289.
- Hara, C., Kiho, T., Tanaka, Y., Ukai, S. (1982). **Polysaccharides in fungi 9. Anti-inflammatory activity and conformational behavior of a branched (1-(3)- β -D-glucan from an alkaline extract of *Dictyophora indusiata* fisch.** *Carbohydrate Research* 110, 77-87.
- Harada, S., Koyanagi, Y., Yamamoto, N. (1985). **Infection of HTLV-III/lav in HTLV-I-carrying cells MT-2 and MT-4 and application in a plaque-assay.** *Science* 229, 563-566.
- Harden, E.A., Falshaw, R., Carnachan, S.M., Kern, E.R., Prichard, M.N. (2009). **Virucidal activity of polysaccharide extracts from four algal species against herpes simplex virus.** *Antiviral Research* 83, 282-289.
- Hashimoto, K., Kodama, E., Mori, S., Watanabe, J., Baba, M., Okutani, K., Matsuda, M., Shigeta, S. (1996). **Antiviral activity of a sulfated polysaccharide extracted from the marine *Pseudomonas* and marine plant *Dinoflagellata* against human immunodeficiency viruses and other enveloped viruses.** *Antiviral Chemistry and Chemotherapy* 7, 189-196.
- Hashimoto, K., Yoshida, M., Hasumi, K. (2011). **Isolation and characterization of CcAbf62A, a GH62 α -L-arabinofuranosidase from the Basidiomycete *Coprinopsis cinerea*.** *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 75, 342-345.
- Haslin, C., Lahaye, M., Pellegrini, M., Chermann, J.C. (2001). **In vitro anti-HIV activity of sulfated cell-wall polysaccharides from gametic, carposporic and tetrasporic stages of the mediterranean red alga *Asparagopsis armata*.** *Planta Medica* 67, 301-305.
- Hassan, H., Drize, N., Sadovinkova, E., Gan, O., Gohla, S., Schrum, S.R.N. (1996). **TPS9, an anti-human immunodeficiency virus (HIV-1) agent, isolated from the Cupressaceae *Thuja occidentalis* L. (Arborvitae), enhances in vivo hemopoietic progenitor cells recovery in sublethally irradiated mice.** *Immunological Methods* 50, 119-122.
- Hattori, T., Ikematsu, S., Koito, A., Matsushita, S., Maeda, Y., Hada, M., Fujimaki, M., Takatsuki, K. (1989). **Preliminary evidence for inhibitory effect of glycyrrhizin on HIV replication in patients with AIDS.** *Antiviral Research* 11, 255-261.
- Hayashi, K., Kamiya, M., Hayashi, T. (1995). **Virucidal effects of the steam distillate from *Houttuynia cordata* and its components on HSV-1, influenza virus and HIV.** *Planta Medica* 61, 237-241.
- Hayashi, K., Hayashi, H., Hiraoka, N., Ikeshiro, Y. (1997). **Inhibitory activity of soyasaponin II on virus replication in vitro.** *Planta Medica* 63, 102-105.

- He, Y.M., Liu, C.H., Chen, Y.X., Ji, A.C., Shen, Z.L., Xi, T., Yao, Q.S. (2007). **Isolation and structural characterization of a novel polysaccharide prepared from *Arca subcrenata* Lischke.** *Journal of Bioscience and Bioengineering* 104, 111-116.
- He, J., Chen, X., Li, M., Zhao, Y., Xu, G., Cheng, X., Peng, L., Xie, M., Zheng, Y., Wang, Y., Zhao, Q. (2009). **Lycojapodine A, a novel alkaloid from *Lycopodium japonicum*.** *Organic Letters* 11, 6.
- Hegde, V., Chan, T., Pu, H., Gullo, V., Patel, M., Das, P., Wagner, N., Parameswaran, P., Naik, C. (2002). **Two selective novel triterpene glycosides from sea cucumber *Telenata ananas*: inhibitors of chemokine receptor-5.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 12, 3203-3205.
- Henkel, T., Brunne, R.M., Müller, H., Reichel, F. (1999) **Statistical investigation into the structural complementarity of natural products and synthetic compounds.** *Angewandte Chemie International* 38, 643-647.
- Herold, B.C., Bourne, N., Marcellino, D., Kirkpatrick, R., Strauss, D.M., Zaneveld, L.J.D., Waller, D.P., Anderson, R.A., Chany, C.J., Barham, B.J., Stanberry, L.R., Cooper, M.D. (2000). **Poly(sodium 4-styrene sulfonate): an effective candidate topical antimicrobial for the prevention of sexually transmitted diseases.** *Journal of Infectious Diseases* 181, 770-773.
- Herrera, C., Cranage, M., McGowan, I., Antón, P., Shattock, R.J. (2009). **Reverse transcriptase inhibitors as potential colorectal microbicides.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53, 1797-1807.
- Heywood, V., Harborne, J., Turner, B. (1977). **The Biology and Chemistry of the Compositae**, Vol. II, Ed. Academic Press, London, U.K.
- Heywood, V. (1993). **Flowering Plants of the World**, Ed. Oxford University Press, Oxford, U.K.
- Hidari, K.I.P.J., Takahashi, N., Arihara, M., Nagaoka, M., Morita, K., Suzuki, T. (2008). **Structure and anti-dengue virus activity of sulfated polysaccharide from a marine alga.** *Biochemical and Biophysical Research Communications* 376, 91-95.
- Hiscott, J., Nguyen, T.L.A., Arguello, M., Nakhaei, P., Paz, S. (2006). **Manipulation of the nuclear factor- κ B pathway and the innate immune response by viruses.** *Oncogene* 25, 6844-6867.
- Hladik, F., Mc Elrath, M.J. (2008). **Setting the stage: host invasion by HIV.** *Natural Review Immunology* 8, 447-457
- Holderness, J., Schepetkin, I.A., Freedman, B., Kirpotina, L.N., Quinn, M.T., Hedges, J.F., Jutila, M.A. (2011). **Polysaccharides isolated from Acai fruit induce innate immune responses.** *PLoS One* 6, e17301.
- Holl, V., Xu, K., Peressin, M., Lederle, A., Biedma, M.E., Delaporte, M., Decoville, T., Schmidt, S., Laumond, G., Aubertin, A.M., Moog, C. (2010). **Stimulation of HIV-1 replication in immature dendritic cells in contact with primary CD4 T or B lymphocytes.** *Journal of Virology* 84, 4172-4182.
- Hollingsworth, M.A., Sherwood, J.E., Dazzo, F.B. (1984). **Bacteriophage-induced acidic heteropolysaccharide lyases that convert the acidic heteropolysaccharides of *Rhizobium trifolii* into oligosaccharide units.** *Journal of Bacteriology* 160, 510-516.
- Hollowood, C., Yamanoi, S., Ley, S. (2003). **Use of pi-allyltricarboxyliron lactone complexes in the synthesis of taurospongins A: a potent inhibitor of DNA**

- polymerase β and HIV reverse transcriptase.** *Organic and Biomolecular Chemistry* 1, 1664-1675.
- Hopfner, M., Alban, S., Schumacher, G., Rothe, U., Bendas, G. (2003). **Selectin-blocking semisynthetic sulfated polysaccharides as promising anti-inflammatory agents.** *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 55, 697-706.
 - Horton, D. (2004). **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, Vol. 59, Ed. Elsevier Academic Press, Amsterdam, Holanda.
 - Horuk, R., Hesselgesser, J., Zhou, Y.Q., Faulds, D., Halks-Miller, M., Harvey, S., Taub, D., Samson, M., Parmentier, M., Rucker, J., Doranz, B.J., Doms, R.W. (1998). **The CC chemokine I-309 inhibits CCR8-dependent infection by diverse HIV-1 strains.** *Journal of Biological Chemistry* 273, 386-391.
 - Hosoya, M., Balzarini, J., Shigeta, S., de Clercq, E. (1991). **Differential inhibitory effects of sulfated polysaccharides and polymers on the replication of various myxoviruses and retroviruses, depending on the composition of the target amino-acid-sequences of the viral envelope glycoproteins.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 35, 2515-2520.
 - Hromadkova, Z., Ebringerova, A., Hirsch, J., Vrchotova, N. (2010). **Isolation and characterisation of polysaccharides from the spelt grain.** *Proceedings of the 6th International Conference on Polysaccharides Glycoscience* 108, 111.
 - Hu, C.Q., Chen, K., Shi, Q., Kilkuskie, R.E., Cheng, Y.C., Lee, K.H. (1994). **Anti-AIDS agents 10. Acacetin-7-O- β -D-galactopyranoside, an anti-HIV principle from *Chrysanthemum morifolium* and a structure-activity correlation with some related flavonoids.** *Journal of Natural Products* 57, 42-51.
 - Hu, Q., Huang, X., Shattock, R.J. (2010a). **C-C chemokine receptor type 5 (CCR5) utilization of transmitted and early founder human immunodeficiency virus type 1 envelopes and sensitivity to small-molecule CCR5 inhibitors.** *Journal of General Virology* 91, 2965-2973.
 - Hu, X.F., Neoh, K.G., Shi, Z.L., Kang, E.T., Poh, C., Wang, W. (2010b). **An *in vitro* assessment of titanium functionalized with polysaccharides conjugated with vascular endothelial growth factor for enhanced osseointegration and inhibition of bacterial adhesion.** *Biomaterials* 31, 8854-8863.
 - Hu, Y.Q., Nie, H.L., White, C.B., Zhao, Z., Zhu, L.M. (2010c). **Isolation and characterization of hemicelluloses from cottonseed coat waste.** *Journal of Biobased Materials and Bioenergy* 4, 446-451.
 - Huang, X., Wang, D., Hu, Y., Lu, Y., Guo, Z., Kong, X., Sun, J. (2008). **Effect of sulfated astragalus polysaccharide on cellular infectivity of infectious bursal disease virus.** *International Journal of Biological Macromolecules* 42, 166-171.
 - Huang, P.L., Chang, J.F., Lin, Y.S., Lu, S.S. (2009). **Micromachined V-band CMOS bandpass filter with 2 DB insertion loss.** *Electronics Letters* 45, 100-101.
 - Huang, S.Q., Ning, Z.X. (2010). **Extraction of polysaccharide from *Ganoderma lucidum* and its immune enhancement activity.** *International Journal of Biological Macromolecules* 47, 336-341.
 - Hudson, J.B., Lee, M.K., Rasoanaivo, P. (2000). **Antiviral activities in plants endemic to Madagascar.** *Pharmaceutical Biology* 38, 36-39.

-
- Huerta-Reyes, M., Basualdo, M.D., Lozada, L., Jimenez-Estrada, M., Soler, C., Reyes-Chilpa, R. (2004). **HIV-1 inhibition by extracts of Clusiaceae species from Mexico.** *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 27, 916-920.
 - Hui, B., Li, J., Geng, M.Y. (2008). **Sulfated polymannuroguluronate, a novel anti-acquired immune deficiency syndrome drug candidate, decreased vulnerability of PC12 cells to human immunodeficiency virus *tat* protein through attenuating calcium overload.** *Journal of Neuroscience Research* 86, 1169-1177.
 - Huskens, D., Vermeire, K., Vandemeulebroucke, E., Balzarini, J., Schols, D. (2008). **Safety concerns for the potencial use of cyanovirin-N as a microbicidal anti-HIV agent.** *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 40, 2802-2814
 - Hussein, G., Miyashiro, H., Nakamura, N., Hattori, M., Kawahata, T., Otake, T., Kakiuchi, N., Shimotohno, K. (1999). **Inhibitory effects of Sudanese plant extracts on HIV-1 replication and HIV-1 protease.** *Phytotherapy Research* 13, 31-36.
 - Ibañez, L. (2007). **Markers, anti-tumoral and anti-HIV effects of leaves and bark of *Calophyllum brasiliensis*, Lagarto Caspi Santa Maria, Bari of Satipo and Pucallpa Regions (Peru-South America).** *Revista Horizonte Médico* 7, 63-70.
 - Imran, S., Gillis, R.B., Kok, M.S., Harding, S.E., Adams, G.G. (2012). **Application and use of inulin as a tool for therapeutic drug delivery.** *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews* 28, 33-45.
 - Inngjerdingen, K.T., Coulibaly, A., Diallo, D., Michaelsen, T.E., Paulsen, B.S. (2006). **A complement fixing polysaccharide from *Biophytum petersianum* Klotzsch, a medicinal plant from Mali, West Africa.** *Biomacromolecules* 7, 48-53
 - Inngjerdingen, K.T., Kiyohara, H., Matsumoto, T., Petersen, D., Michaelsen, T.E., Diallo, D., Inngjerdingen, M., Yamada, H., Paulsen, B.S. (2007). **An immunomodulating pectic polymer from *Glinus oppositifolius*.** *Phytochemistry* 68, 1046-1058.
 - Inngjerdingen, M., Inngjerdingen, K.T., Patel, T.R., Allen, S., Chen, X.Y., Rolstad, B., Morris, G.A., Harding, S.E., Michaelsen, T.E., Diallo, D., Paulsen, B.S. (2008). **Pectic polysaccharides from *Biophytum petersianum* Klotzsch, and their activation of macrophages and dendritic cells.** *Glycobiology* 18, 1074-1084.
 - Ishida, J., Wang, H., Oyama, M., Cosentino, M., Hu, C., Lee, K. (2001). **Anti-AIDS agents 46. Anti-HIV activity of harman, an anti-HIV principle from *Symplocos setchuensis*, and its derivatives.** *Journal of Natural Products* 64, 958-960.
 - Jacobo-Salcedo, M.D.R., Alonso-Castro, A.J., Salazar-Olivo, L.A., Carranza-Alvarez, C., Gonzalez-Espindola, L.A., Dominguez, F., Maciel-Torres, S.P., Garcia-Luján, C., Gonzalez-Martínez, M.D.R., Gomez-Sanchez, M., Estrada-Castillon, E., Zapata-Bustos, R., Medellin-Milán, P., García-Carranca, A. (2011). **Antimicrobial and cytotoxic effects of Mexican medicinal plants.** *Natural Product Communications* 6, 1925-1928.
 - Jiang, M.H., Zhu, L.A., Jiang, J.G. (2010). **Immunoregulatory actions of polysaccharides from Chinese herbal medicine.** *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 14, 1367-1402.
 - Jiang, C.X., Wang, M.C., Liu, J., Gan, D., Zeng, X.X. (2011). **Extraction, preliminary characterization, antioxidant and anticancer activities *in vitro* of polysaccharides from *Cyclina sinensis*.** *Carbohydrate Polymers* 84, 851-857.
-

- Jiao, L.L., Li, X., Li, T.B., Jiang, P., Zhang, L.X., Wu, M.J., Zhang, L.P. (2009). **Characterization and anti-tumor activity of alkali-extracted polysaccharide from *Enteromorpha intestinalis***. *International Immunopharmacology* 9, 324-329.
- Jiao, G.L., Yu, G.L., Zhang, J.Z., Ewart, H.S. (2011). **Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae**. *Marine Drugs* 9, 196-223.
- Jin-Fa, C., Yo-Sheng, L., Pen-Li, H., Shey-Shi, L. (2009). A micromachined V-band CMOS bandpass filter with 2-dB insertion-loss. 2009 IEEE 59th Electronic Components and Technology Conference (ECTC 2009), 1590-1593.
- Jiratchariyakul, W., Wiwat, C., Vongsakul, M., Somanabandhu, A., Leelamanit, W., Fujii, I., Suwannaroj, N., Ebizuka, Y. (2001). **HIV inhibitor from Thai bitter gourd**. *Planta Medica* 67, 350-353.
- Johansson, S., Gullbo, J., Lindholm, P., Ek, B., Thunberg, E., Samuelsson, G., Larsson, R., Bohlin, L., Claeson, P. (2003). **Small, novel proteins from the mistletoe *Phoradendron tomentosum* exhibit highly, selective cytotoxicity to human breast cancer cells**. *Cellular and Molecular Life Sciences* 60, 165-175.
- Johnson, T.J., Gupta, K.M., Fabian, J., Albright, T.H., Kiser, P.F. (2010). **Segmented polyurethane intravaginal rings for the sustained combined delivery of antiretroviral agents dapivirine and tenofovir**. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 39, 203-212.
- Jordan, M.J., Sanchez-Gomez, P., Jimenez, J.F., Quilez, M., Sotomayor, J.A. (2010). **Chemical composition and antiradical activity of the essential oil from *Satureja intricata*, *S. obovata* and their hybrid *Satureja x delpozoi***. *Natural Product Communications* 5, 629-634.
- Josephson, F. (2010). **Drug-drug interactions in the treatment of HIV infection: focus on pharmacokinetic enhancement through CYP3A inhibition**. *Journal of Internal Medicine* 268, 530-539.
- Kahlon, J., Kemp, M., Yawei, N., Carpenter, R. (1991). **In vitro evaluation of the synergistic antiviral effects of acemannan in combination with azidothymidine and acyclovir**. *Molecular Biotherapy*, 3, 214-223.
- Kallawaya, L. (1980). Curanderos Itinerantes de los Andes. Quipus. La Paz, Ed. UNICEF-OPS-OMS
- Kang, S.Y., Kim, S.R., Oh, M.J. (2008). **In vitro antiviral activities of Korean marine algae extracts against fish pathogenic infectious hematopoietic necrosis virus and infectious pancreatic necrosis virus**. *Food Science and Biotechnology* 17, 1074-1078.
- Kang, D.Z., Liu, D., Jo, S.Y., Kang, T.B., Lee, J.M., Suh, H.J., Kim, A.J., Yoon, T.J. (2010). **Effects of fermented ginseng extracts on tumour metastasis in mice**. *Food Science and Biotechnology* 19, 1559-1565.
- Karabay-Yavasoglu, N.U., Baykan, S., Ozturk, B., Apaydin, S., Tuglular, I. (2006). **Evaluation of the antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Satureja thymbra* L. essential oil**. *Pharmaceutical Biology* 44, 585-591.
- Karmakar, P., Ghosh, T., Sinha, S., Saha, S., Mandal, P., Ghosal, P.K., Ray, B. (2009). **Polysaccharides from the brown seaweed *Padina tetrastratica*: characterization of a sulfated fucan**. *Carbohydrate Polymers* 78, 416-421.

- Karmakar, P., Pujol, C.A., Damonte, E.B., Ghosh, T., Ray, B. (2010). **Polysaccharides from *Padina tetrastratica*: structural features, chemical modification and antiviral activity.** *Carbohydrate Polymers* 80, 513-520.
- Karnjanapratum, S., You, S. (2011). **Molecular characteristics of sulfated polysaccharides from *Monostroma nitidum* and their *in vitro* anticancer and immunomodulatory activities.** *International Journal of Biological Macromolecules* 48, 311-318.
- Kashiwada, Y., Wang, H.K., Nagao, T., Kitanaka, S., Yasuda, I., Fujioka, T., Yamagishi, T., Cosentino, L.M., Kozuka, M., Okabe, K., Ikeshiro, Y., Hu, C.Q., Yeh, E., Lee, K.H. (1998). **Anti-AIDS agents 30. Anti-HIV activity of oleanolic acid, pomolic acid, and structurally related triterpenoids.** *Journal of Natural Products* 61, 1090-1095.
- Kaushic, C., Ferreira, V.H., Kafka, J.K., Nazli, A. (2010). **HIV infection in the female genital tract: discrete influence of the local mucosal microenvironment.** *American Journal of Reproductive Immunology* 63, 566-575.
- Kawamura, T., Sugaya, M., Shimada, S., Blauvelt, A. (2003). **R5 HIV interacts with LC through a CCR5-dependent, DC-SIGN-independent infection pathway.** *Journal of Investigative Dermatology* 121, 1240.
- Kawamura, T., Kurtz, S.E., Blauvelt, A., Shimada, S. (2005). **The role of the Langerhans cells in the sexual transmission of HIV.** *Journal of Dermatological Sciences* 40, 147-155.
- Kawamura, T. (2011). **Mechanism for HIV invasion via skin or mucosa.** *Virus* 61, 59-65.
- Keller, M.J., Zerhouni-Layachi, B., Cheshenko, N., John, M., Hogarty, K., Kasowitz, A., Goldberg, C.L., Wallenstein, S., Profy, A.T., Klotman, M.E., Herold, B.C. (2006). **PRO 2000 gel inhibits HIV and herpes simplex virus infection following vaginal application: a double-blind placebo-controlled trial.** *Journal of Infectious Diseases* 193, 27-35.
- Kernan, M.R., Sendl, A., Chen, J.L., Jolad, S.D., Blanc, P., Murphy, J.T., Stoddart, C.A., Nanakorn, W., Balick, M.J., Rozhon, E.J. (1997). **Two new lignans with activity against influenza virus from the medicinal plant *Rhinacanthus nasutus*.** *Journal of Natural Products* 60, 635-637.
- Kernan, M.R., Amarquaye, A., Chen, J.L., Chan, J., Sesin, D.F., Parkinson, N., Ye, Z.J., Barrett, M., Bales, C., Stoddart, C.A., Blanc, P., Sloan, B., Limbach, C., Mrisho, S., Rozhon, E.J. (1998). **Antiviral phenylpropanoid glycosides from the medicinal plant *Markhamia lutea*.** *Journal of Natural Products* 61, 564-570.
- Khajeh, M., Yamini, Y., Sefidkon, F., Bahramifar, N. (2004). **Comparison of essential oil composition of *Carum copticum* obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation methods.** *Food Chemistry* 86, 587-591.
- Khramova, D.S., Golovchenko, V.V., Shashkov, A.S., Otgonbayar, D., Chimidsogzol, A., Ovodov, Y.S. (2011). **Chemical composition and immunomodulatory activity of a pectic polysaccharide from the ground thistle *Cirsium esculentum* Siev.** *Food Chemistry* 126, 870-877.
- Kiho, T., Sakai, M., Ukai, S., Hara, C., Tanaka, Y. (1985). **Polysaccharides in fungi 16. Anti-inflammatory effect of the polysaccharide from the fruit bodies of *Auricularia* species.** *Carbohydrate Research* 142, 344-351.

- Kilmarx, P.H., Van de Wijgert, J.H., Chaikummao, S. (2006). **Safety and acceptability of the candidate microbicide carraguard in Thai women: findings from a phase II clinical trial.** *Journal of Acquired Immunodeficiency Syndrome* 43, 327-334.
- Kilmarx, P.H., Blanchard, K., Chaikummao, S. (2008). **A randomized placebo-controlled trial to asses the safety and aceptability of use of carraguard vaginal gel by heterosexual couples in Thailand.** *Sexual Transmission Disease* 35, 226-232
- Kim, S.W., Hwang, H.J., Lee, B.C., Yun, J.W. (2007a). **Submerged production and characterization of *Grifola frondosa* polysaccharides: a new application to cosmeceuticals.** *Food Technology and Biotechnology* 45, 295-305.
- Kim, A.J., Kim, Y.O., Shim, J.S., Hwang, J.K. (2007b). **Immunostimulating activity of crude polysaccharide extract isolated from *Curcuma xanthorrhiza* Roxb.** *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 71, 1428-1438.
- Kim, S.K., Karadeniz, F. (2011). **Anti-HIV activity of extracts and compounds from marine algae.** *Advances in Food and Nutrition Research* 64, 255-265.
- Kim, M., Yim, J.H., Kim, S.Y., Kim, H.S., Lee, W.G., Kim, S.J., Kang, P.S., Lee, C.K. (2012). ***In vitro* inhibition of influenza A virus infection by marine microalga-derived sulfated polysaccharide p-KG03.** *Antiviral Research* 93, 253-259.
- Kindt, T.J., Goldsby, R.A., Osborne, B.A. (2007). **Kuby Immunology**, 6^a ed., Ed. W.H. Freeman & Co Ltd., London, U.K.
- Kinghorn, D.A., Pan, L., Fletcher, N.J., Chai, H. (2011) **The relevance of higher plants in lead compound discovery.** *Journal of Natural Products* 74, 1539-1555.
- Kiran, O.E., Ilcim, A., Digrak, M. (2010). **Antifungall activity against *Phytophthora capsici* leon which causes root neck burn in pepper around Kahramanmaras.** *Asian Journal of Chemistry* 22, 468-474.
- Kiyohara, H., Takemoto, N., Komatsu, Y., Kawamura, H., Hosoya, E., Yamada, H. (1991). **Studies on immunologically active substances from Kampo medicine Juzen-Taiho-To 2. Characterization of mitogenic pectic polysaccharides from Kampo (Japanese herbal) medicine Juzen-Taiho-To.** *Planta Medica* 57, 254-259.
- Komane, B.M., Olivier, E.I., Viljoen, A.M. (2011). ***Trichillia emetica* (Meliaceae): a review of traditional uses, biological activities and phytochemistry.** *Phytochemistry Letters* 4, 1-9.
- Kong, Y., Le, Y. (2011). **Toll-like receptors in inflammation of the central nervous system.** *International Immunopharmacology* 11, 1407-1414.
- Konoshima, T., Yasuda, I., Kashiwada, Y., Cosentino, L.M., Lee, K.H. (1995). **Anti-AIDS agents 21. Triterpenoid saponins as anti-HIV principles from fruits of *Gleditsia japonica* and *Gymnocladus chinensis*, and a structure-activity correlation.** *Journal of Natural Products* 58, 1372-1377.
- Kopf, M., Bachmann, M.F., Marsland, B.J. (2010). **Averting inflammation by targeting the cytokine environment.** *Nature Reviews Drug Discovery* 9, 703-718.
- Kosar, M., Demirci, B., Demirci, F., Baser, K.H.C. (2008). **Effect of maturation on the composition and biological activity of the essential oil of a commercially important *Satureja* species from Turkey: *Satureja cuneifolia* Ten. (Lamiaceae).** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 2260-2265.
- Kostalova, Z., Hromadkova, Z., Ebringerova, A., Nosal' ova, G., Prisenznakova, L. (2010). **Isolation, structure and properties of pectic polysaccharides from the**

- Pumpkin (*Cucurbita pepo* L. var. *styriaca*).** *Proceedings of the 6th International Conference on Polysaccharides-Glycoscience*, 12-16.
- Kostova, I. (2006). **Coumarins as inhibitors of HIV reverse transcriptase.** *Current HIV Research* 4, 347-363.
 - Kotan, R., Cakir, A., Dadasoglu, F., Aydin, T., Cakmakci, R., Ozer, H., Kordali, S., Mete, E., Dikbas, N. (2010). **Antibacterial activities of essential oils and extracts of Turkish *Achillea*, *Satureja* and *Thymus* species against plant pathogenic bacteria.** *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90, 145-160.
 - Koyanagi, Y., Miles, S., Mitsuyasu, R.T., Merrill, J.E., Vinters, H.V., Chen, I.S.Y. (1987). **Dual infection of the central nervous system by AIDS viruses with distinct cellular tropisms.** *Science* 236, 819-822.
 - Krwisiwjk, E. (2005). Thin Layer Chromatography Visualisation Reagents (Aberaman).
 - Kuang, H.X., Xia, Y.G., Liang, J., Yang, B.Y., Wang, Q.H., Sun, Y.P. (2011a). **Fast classification and compositional analysis of polysaccharides from TCMs by ultra-performance liquid chromatography coupled with multivariate analysis.** *Carbohydrate Polymers* 84, 1258-1266.
 - Kuang, H.X., Xia, Y.G., Yang, B.Y., Wang, Q.H., Wang, Y.H. (2011b). **Screening and comparison of the immunosuppressive activities of polysaccharides from the stems of *Ephedra sinica* Stapf.** *Carbohydrate Polymers* 83, 787-795.
 - Kumar, G.S. (2012). **RNA targeting by small molecules: binding of protoberberine, benzophenanthridine and *Aristolochia* alkaloids to various RNA structures.** *Journal of Biosciences* 37, 539-552.
 - Kundakovic, T., Milenkovic, M., Zlatkovic, S., Kovacevic, N., Goran, N. (2011). **Composition of *Satureja kitaibelii* essential oil and its antimicrobial activity.** *Natural Product Communications* 6, 1353-1356.
 - Kundu, A., Barik, B., Mondal, D., Dey, A., Banerji, A. (1989). **Zizyberanolic acid, a pentacyclic triterpenoid of *Ziziphus jujuba*.** *Phytochemistry* 28, 3155-3158.
 - Kuroyanagi, M., Fujita, K., Kazaoka, M., Matsumoto, S., Ueno, A., Fukushima, S., Katsuoka, M. (1985). **Studies on the constituents of *Baccharis genistelloides*.** *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 33, 5075-5078.
 - Kwan, E.E., Huang, S.G. (2008). **Structural elucidation with NMR spectroscopy: practical strategies for organic chemists.** *European Journal of Organic Chemistry* 16, 2671-2688.
 - Lacey, C.J.N., Wright, A., Weber, J.N., Profy, A.T. (2006). **Direct measurement of *in vivo* vaginal microbicide levels of PRO 2000 achieved in a human safety study.** *AIDS* 20, 1027-1030.
 - Lai, F., Loy, G., Manconi, M., Manca, M.L., Fadda, A.M. (2007). ***Artemisia arborescens* L. essential oil loaded beads: preparation and characterization.** *AAPS PharmSciTech* 8, E126-E132.
 - Laine, R.A., Esselman, W.J., Sweeley, C.C. (1972). **Gas-liquid chromatography of carbohydrates.** *Methods Enzymology* 2, 159-167.
 - Lall, N., Meyer, J.J.M., Taylor, M.B. (2005). **Anti-HSV-1 activity of *Euclea natalensis*.** *South African Journal of Botany* 71, 444-446.
 - Lambert, A.A., Gilbert, C., Richard, M., Beaulieu, A.D., Tremblay, M.J. (2008). **The C-type lectin surface receptor DICIR acts as a new attachment factor for HIV-1 in**

- dendritic cells and contributes to *trans*- and *cis*-infection pathways. *Blood* 112, 1299-1307.
- Lameira, J., Medeiros, I., Reis, M., Santos, A., Alves, C. (2006). **Structure–activity relationship study of flavone compounds with anti–HIV–1 integrase activity: a density functional theory study.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 14, 7105-7112.
 - Lan, M.B., Zhang, Y.H., Zheng, Y., Yuan, H.H., Zhao, H.L., Gao, F. (2010). **Antioxidant and immunomodulatory activities of polysaccharides from Moxa (*Artemisia argyi*) leaf.** *Food Science and Biotechnology* 19, 1463-1469.
 - Lange, U., Teichmann, J., Stracke, H. (2000). **Correlation between plasma TNF- α , IGF-1, biochemical markers of bone metabolism, markers of inflammation/disease activity, and clinical manifestations in ankylosing spondylitis.** *European Journal of Medical Research* 5, 507-511.
 - Lavi, I., Levinson, D., Peri, I., Nimri, L., Hadar, Y., Schwartz, B. (2010). **Orally administered glucans from the edible mushroom *Pleurotus pulmonarius* reduce acute inflammation in dextran sulfate sodium-induced experimental colitis.** *British Journal of Nutrition* 103, 393-402.
 - Leal, J.A., Jiménez-Barbero, J., Bernabe, M., Prieto, A. (2008). **Structural elucidation of a cell wall fungal polysaccharide isolated from *Ustilaginoidea virens*, a pathogenic fungus of *Oriza sativa* and *Zea mays*.** *Carbohydrate Research* 343, 2980-2984.
 - Leaman, J. (2001). **Conservation, Trade, Sustainability and Exploitation of Medicinal Plant Species**, In: “Development in Plant-Based Medicines: Conservation, Efficacy and Safety”, Ed. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
 - Lee, H.H., Lee, J.S., Cho, J.Y., Kim, Y.E., Hong, E.K. (2009). **Study on immunostimulating activity of macrophage treated with purified polysaccharides from liquid culture and fruiting body of *Lentinus edodes*.** *Journal of Microbiology and Biotechnology* 19, 566-572.
 - Lee, J.S., Kwon, J.S., Won, D.P., Lee, K.E., Shin, W.C., Hong, E.K. (2010a). **Study on macrophage activation and structural characteristics of purified polysaccharide from the liquid culture broth of *Cordyceps militaris*.** *Carbohydrate Polymers* 82, 982-988.
 - Lee, S.M., Kim, S.M., Lee, Y.H., Kim, W.J., Park, J.K., Park, Y.I., Jang, W.J., Shin, H.D., Synytsya, A. (2010b). **Macromolecules isolated from *Phellinus pini* fruiting body: chemical characterization and antiviral activity.** *Macromolecular Research* 18, 602-609.
 - Lee, J.B., Yamagishi, C., Hayashi, K., Hayashi, T. (2011a). **Antiviral and immunostimulating effects of lignin-carbohydrate-protein complexes from *Pimpinella anisum*.** *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 75, 459-465.
 - Lee, J.K., Kim, J.H., Shin, H.K. (2011b). **Therapeutic effects of the oriental herbal medicine Sho-Saiko-To on liver cirrhosis and carcinoma.** *Hepatology Research* 41, 825-837.
 - Lee-Huang, S., Huang, P., Bourinbaiar, A., Chen, H., Kung, H. (1995). **Inhibition of integrase of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 by anti-HIV plants proteins MAP30 and GAP31.** *Proceedings of the Natural Academy for Sciences USA* 92, 8818-8822.

- Lee-Huang, S., Huang, P.L., Zhang, D., Lee, J.W., Bao, J., Sun, Y., Chang, Y.T., Zhang, J., Huang, P.L. (2007a). **Discovery of small-molecule HIV-1 fusion and integrase inhibitors oleuropein and hydroxytyrosol. Part 1: fusion inhibition.** *Biochemical and Biophysical Research Communications* 354, 872-878.
- Lee-Huang, S., Huang, P.L., Zhang, D., Lee, J.W., Bao, J., Sun, Y., Chang, Y.T., Zhang, J., Huang, P.L. (2007b). **Discovery of small-molecule HIV-1 fusion and integrase inhibitors oleuropein and hydroxytyrosol. Part II: Integrase inhibition.** *Biochemical and Biophysical Research Communications* 354, 879-884.
- Leiro, J.M., Castro, R., Arranz, J.A., Lamas, J. (2007). **Immunomodulating activities of acidic sulfated polysaccharides obtained from the seaweed *Ulva rigida* C. Agardh.** *International Immunopharmacology* 7, 879-888.
- Leung, T.F., Wong, K.Y., Wong, C.K., Fung, K.P., Lam, C.W.K., Fok, T.F., Leung, P.C., Hon, K.L.E. (2008). ***In vitro* and clinical immunomodulatory effects of a novel penta-herbs con-coction for atopic dermatitis.** *British Journal of Dermatology* 158, 1216-1223.
- Li, C.J., Ahmed, A.A., Arias, A.D., Mabry, T.J. (1997). **Clerodane diterpenoids, long chain esters of coumaric acid and other compounds from *Baccharis myrsinites*.** *Phytochemistry* 45, 571-574.
- Li, S.S., Gullbo, J., Lindholm, P., Larsson, R., Thunberg, E., Samuelsson, G., Bohlin, L., Claeson, P. (2002). **Ligatoxin B, a new cytotoxic protein with a novel helix-turn-helix DNA-binding domain from the mistletoe *Phoradendron liga*.** *Biochemical Journal* 366, 405-413.
- Li, J.W., Vederas, J.C. (2009) **Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier?.** *Science* 325, 161-165.
- Li, Q., Estes, J.D., Schlievert, P.M., Duan, L., Brosnahan, A.J., Southern, P.J., Reilly, C.S., Peterson, M.L., Schultz-Darken, N., Brunner, K.G., Nephew, K.R., Pambuccian, S., Lifson, J.D., Carlis, J.V., Haase, A.T. (2009). **Glycerol monolaurate prevents mucosal SIV transmission.** *Nature* 458, 1034-1040.
- Li, R., Chen, W.C., Wang, W.P., Tian, W.Y., Zhang, X.G. (2010a). **Antioxidant activity of *Astragalus* polysaccharides and antitumour activity of the polysaccharides and siRNA.** *Carbohydrate Polymers* 82, 240-244.
- Li, L.Y., Li, L.Q., Guo, C.H. (2010b). **Evaluation of *in vitro* antioxidant and antibacterial activities of *Laminaria japonica* polysaccharides.** *Journal of Medicinal Plants Research* 4, 2194-2198.
- Li, D.H., Sun, C.Y., Wang, Z.B., Wang, Z.Q. (2011a). **The immunomodulating effect of polysaccharides purified from *Pholiota adiposa*.** *Environmental Biotechnology and Materials Engineering* 183, 1491-1495.
- Li, J.E., Nie, S.P., Yang, C., Qiu, Z.H., Xie, M.Y. (2011b). **Extraction optimization, characterization and bioactivity of crude polysaccharides from *Herba Moslae*.** *Carbohydrate Polymers* 83, 1201-1206.
- Li, J.W., Liu, Y.F., Fan, L.P., Ai, L.Z., Shan, L.A. (2011c). **Antioxidant activities of polysaccharides from the fruiting bodies of *Zizyphus jujuba* cv. Jinsixiaozao.** *Carbohydrate Polymers* 84, 390-394.
- Liang, B., Jin, M.L., Liu, H.B. (2011). **Water-soluble polysaccharide from dried *Lycium barbarum* fruits: isolation, structural features and antioxidant activity.** *Carbohydrate Polymers* 83, 1947-1951.

- Liao, S.G., Zhang, L.J., Sun, F., Zhang, J.J., Chen, A.Y., Lan, Y.Y., Li, Y.J., Wang, A.M., He, X., Xiong, Y., Dong, L., Chen, X.J., Li, Y.T., Zuo, L., Wang, Y.L. (2011). **Antibacterial and anti-inflammatory effects of extracts and fractions from *Polygonum capitatum***. *Journal of Ethnopharmacology* 134, 1006-1009.
- Lima, B., Lopez, S., Luna, L., Agüero, M.B., Aragón, L., Tapia, A., Zacchino, S., Lopez, M.L., Zygadlo, J., Feresin, G.E. (2011). **Essential oils of medicinal plants from the Central Andes of Argentina: chemical composition, and antifungal, antibacterial, and insect-repellent activities**. *Chemistry & Biodiversity* 8, 924-936.
- Lin, Y.M., Flavin, M.T., Schure, R., Chen, F.C., Sidwell, R., Barnard, D.L., Huffman, J.H., Kern, E.R. (1999). **Antiviral activities of biflavonoids**. *Planta Medica* 65, 120-125.
- Lin, P., Ng, T.B. (2008). **Preparation and biological properties of a melibiose binding lectin from *Bauhinia variegata* seeds**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 10481-10486.
- Lincoln, D.E., Langenheim, J.H. (1978). **Effect of light and temperature on monoterpenoid yield and composition in *Satureja douglasii***. *Biochemical Systematics and Ecology* 6, 21-32.
- Liu, S.W., Jiang, S.B., Wu, Z.H., Lu, L., Zhang, J.J., Zhu, Z.G., Wu, S.G. (2002). **Identification of inhibitors of the HIV-1 gp41 six-helix bundle formation from extracts of Chinese medicinal herbs *Prunella vulgaris* and *Rhizoma cibotae***. *Life Sciences* 71, 1779-1791.
- Liu, F., Liu, Y., Meng, Y., Yang, M., He, K. (2004). **Structure of polysaccharide from *Polygonatum cyrtoneura* Hua and the antiherpetic activity of its hydrolyzed fragments**. *Antiviral Research* 63, 183-189.
- Liu, Y.H., Wang, F.S. (2007). **Structural characterization of an active polysaccharide from *Phellinus ribis***. *Carbohydrate Polymers* 70, 386-392.
- Liu, L., Guo, Z.J., Lu, Z.G., Sun, Y., Cao, W., Zhang, R., Liu, Z.G., Li, C., Cao, S.S., Mei, Q.B. (2008). **The beneficial effect of *Rheum tanguticum* polysaccharide on protecting against diarrhoea, colonic inflammation and ulceration in rats with TNBS-induced colitis: the role of macrophage mannose receptor in inflammation and immune response**. *International Immunopharmacology* 8, 1481-1492.
- Liu, C., Li, J.Q., Meng, F.Y., Liang, S.X., Deng, R.X., Li, C.K., Pong, N.H., Lau, C.P., Cheng, S.W., Ye, J.Y., Chen, J.L., Yang, S.T., Yan, H.X., Chen, S.L., Chong, B.H., Yang, M. (2010a). **Polysaccharides from the root of *Angelica sinensis* promotes hematopoiesis and thrombopoiesis through the PI3K/AKT pathway**. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 10, 79-91.
- Liu, T., Zhao, J., Li, H.B., Ma, L. (2010b). **Evaluation on anti-hepatitis viral activity of *Vitis vinifera* L.** *Molecules* 15, 7415-7422.
- Liu, X.L., Xi, Q.Y., Yang, L., Li, H.Y., Jiang, Q.Y., Shu, G., Wang, S.B., Gao, P., Zhu, X.T., Zhang, Y.L. (2011a). **The effect of dietary *Panax ginseng* polysaccharide extract on the immune responses in white shrimp, *Litopenaeus vannamei***. *Fish & Shellfish Immunology* 30, 495-500.
- Liu, X.X., Wan, Z.J., Shi, L., Lu, X.X. (2011b). **Preparation and antiherpetic activities of chemically modified polysaccharides from *Polygonatum cyrtoneura* Hua**. *Carbohydrate Polymers* 83, 737-742.

-
- Lizarraga, E., Abdala, L. (2004). **Componentes fenólicos mayoritarios en *Satureja boliviana* (Benth) Briq (Lamiaceae).** *Acta Farmaceutica Bonaerense* 23, 198-200.
 - Loetscher, M., Geiser, T., Oreilly, T., Zwahlen, R., Baggiolini, M., Moser, B. (1994). **Cloning of a human 7-transmembrane domain receptor, lestr, that is highly expressed in leukocytes.** *Journal of Biological Chemistry* 269, 232-237.
 - Loewus, F.A. (1952). Improvement in Anthrone Method for determination of carbohydrates. *Analitical chemistry* 24(1),219
 - Studies on the physical and chemical properties of starch: the retrogradation of amylose in the presence and absence of gelatizing agents and similar compounds.
 - Loizzo, M.R., Saab, A.M., Tundis, R., Statti, G.A., Menichini, F., Lampronti, I., Gambari, R., Cinatl, J., Doerr, H.W. (2008). **Phytochemical analysis and *in vitro* antiviral activities of the essential oils of seven Lebanon species.** *Chemistry & Biodiversity* 5, 461-470.
 - Lopez, S., Armand-Ugon, M., Bastida, J., Viladomat, F., Este, J.A., Stewart, D., Codina, C. (2003). **Anti-human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) activity of lectins from *Narcissus* species.** *Planta Medica* 69, 109-112.
 - Lopez-Martinez, S., Navarrete-Vazquez, G., Estrada-Soto, S., Leon-Rivera, I., Rios, M. (2013). **Chemical constituents of the hemiparasitic plant *Phoradendron brachystachyum* DC Nutt (Viscaceae).** *Natural Product Research* 27, 130-136.
 - Lu, L., Liu, S.W., Jiang, S.B., Wu, S.G. (2004). **Tannin inhibits HIV-1 entry by targeting gp41.** *Acta Pharmacologica Sinica* 25, 213-218.
 - Lu, C.X., Li, J., Sun, Y.X., Qi, X., Wang, Q.J., Xin, X.L., Geng, M.Y. (2007). **Sulfated polymannuroguluronate, a novel anti-AIDS drug candidate, inhibits HIV-1 Tat-induced angiogenesis in Kaposi's sarcoma cells.** *Biochemical Pharmacology* 74, 1330-1339.
 - Lu, W.Z., Geng, G.X., Li, Q.W., Li, J., Liu, F.Z., Han, Z.S. (2010). **Antitumour activity of polysaccharides isolated from *Patrinia heterophylla*.** *Pharmaceutical Biology* 48, 1012-1017.
 - Madan, R.P., Mesquita, P.M.M., Cheshenko, N., Jing, B., Shende, V., Guzman, E., Heald, T., Keller, M.J., Regen, S.L., Shattock, R.J., Herold, B.C. (2007). **Molecular umbrellas: a novel class of candidate topical microbicides to prevent human immunodeficiency virus and herpes simplex virus infections.** *Journal of Virology* 81, 7636-7646.
 - Maeda, K., Nakata, H., Ogata, H., Koh, Y., Miyakawa, T., Mitsuya, H. (2004). **The current status of, and challenges in, the development of CCR5 inhibitors as therapeutics for HIV-1 infection.** *Current Opinion in Pharmacology* 4, 447-452.
 - Mahboubi, M., Kazempour, N. (2011). **Chemical composition and antimicrobial activity of *Satureja hortensis* and *Trachyspermum copticum* essential oil.** *Iranian Journal of Microbiology* 3, 194-200.
 - Malatyali, E., Tepe, B., Degerli, S., Berk, S. (2012). ***In vitro* amoebicidal activities of *Satureja cuneifolia* and *Melissa officinalis* on *Acanthamoeba castellanii* cysts and trophozoites.** *Parasitology Research* 110, 2175-2180.
 - Malcom, R.K., Forbes, C.J., Geer, L., Veazey, R.S., Goldman, L., Klasse, P. J., Moore, J.P. (2013). **Pharmacokinetic and efficacy of a vaginally administered maraviroc gel in rhesus macaques.** *Journal of Antimicrobials and Chemotherapy* 68(3), 678-683
-

- Malim, H.M., Emerman, M. (2008). **HIV accessory proteins-ensuring virus survival in a hostile environment.** *Cell Host & Microbe* 3, 388-398.
- Mandal, P., Pujol, C.A., Damonte, E.B., Ghosh, T., Ray, B. (2010). **Xylans from *Scinaia hatei*: structural features, sulfation and anti-HSV activity.** *International Journal of Biological Macromolecules* 46, 173-178.
- Mandal, S., Patra, S., Dey, B., Bhunia, S.K., Maity, K.K., Islam, S.S. (2011). **Structural analysis of an arabinan isolated from alkaline extract of the endosperm of seeds of *Caesalpinia bonduc* (Nata Karanja).** *Carbohydrate Polymers* 84, 471-476.
- Mansour, H.A., Shoman, S.A., Kdodier, M.H. (2011). **Antiviral effect of edaphic cyanophytes on rabies and herpes-1 viruses.** *Acta Biologica Hungarica* 62, 194-203.
- Marais, D., Gawarecki, D., Allan, B., Ahmed, K., Altini, L., Cassim, N., Gopolang, F., Hoffman, M., Ramjee, G., Williamson, A. (2011). **The effectiveness of carraguard, a vaginal microbicide, in protecting women against high-risk human papillomavirus infection.** *Antiviral Therapy* 16, 1219-1226.
- Marchetti, M., Pisani, S., Pietropaolo, V., Seganti, L., Nicoletti, R., Degener, A., Orsi, N. (1996). **Antiviral effect of a polysaccharide from *Sclerotium gluconicum* towards herpes simplex virus type 1 infection.** *Planta Medica* 62, 303-307.
- Marie, I., Menard, J.F., Hachulla, E., Cherin, P., Benveniste, O., Tiev, K., Hatron, P.Y. (2011). **Infectious complications in polymyositis and dermatomyositis: a series of 279 patients.** *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 41, 48-60.
- Markovic, T., Chaztopoulou, P., Siljegovic, J., Nikolic, M., Glamoclija, J., Ciric, A., Sokovic, M. (2011). **Chemical analysis and antimicrobial activities of the essentials oils of *Satureja thymbra* L. and *Thymbra spicata* L. and their main components.** *Archive of Biological Sciences* 63, 457-464.
- Martin-Aragón, S., Benedi, J., Villar, A. (1994). **Studies on the antiinflammatory and antiulcerogenic activities of *Tuberaria lignosa* extracts in experimental animals.** *International Journal of Pharmacognosy* 32, 27-32.
- Martínez-Avila, O., Bedoya, L.M., Marradi, M., Clavel, C., Alcamí, J., Penades, S. (2009). **Multivalent manno-glyconanoparticles inhibit DC-SIGN-mediated HIV-1 trans-infection of human T cells.** *Chembiochem* 10, 1806-1809.
- Martino, V.S., López, P., Irujo, J.J.M., San Román, M., Cuevas, M.T., Santiago, E., Lasarte, J.J., Font, M., Coussio, J.D., Monge, A. (2002). **Inhibitory effect against polymerase and ribonuclease activities of HIV-reverse transcriptase of the aqueous leaf extract of *Terminalia triflora*.** *Phytotherapy Research* 16, 778-780.
- Martino, V., Morales, J., Martínez-Irujo, J.J., Font, M., Monge, A., Coussio, J. (2004). **Two ellagitannins from the leaves of *Terminalia triflora* with inhibitory activity on HIV-1 reverse transcriptase.** *Phytotherapy Research* 18, 667-669.
- Matsumoto, T., Yamada, H. (1996). **The pectic polysaccharide from *Bupleurum falcatum* L. enhances clearance of immune complexes in mice.** *Phytotherapy Research* 10, 585-588.
- Matsuse, I.T., Lim, Y.A., Hattori, M., Correa, M., Gupta, M.P. (1999). **A search for anti-viral properties in Panamanian medicinal plants: the effects on HIV and its essential enzymes.** *Journal of Ethnopharmacology* 64, 15-22.

- Maury, W., Price, J., Brindley, M., Choon-Seok, O., Neighbors, J., Wiemer, D., Wills, N., Carpenter, S., Hauck, C., Murphy, P., Widrechner, M., Delate, K., Kumar, G., Kraus, G., Rizshsky, L., Nikolau, B. (2009). **Identification of light-independent inhibition of human immunodeficiency virus-1 infection through bioguided fractionation of *Hypericum perforatum*.** *Virology Journal* 6, 101-113.
- Mazumder, A., Wang, S.M., Neamati, N., Nicklaus, M., Sunder, S., Chen, J., Milne, G.W.A., Rice, W.G., Burke, T.R., Pommier, Y. (1996). **Antiretroviral agents as inhibitors of both human immunodeficiency virus type 1 integrase and protease.** *Journal of Medicinal Chemistry* 39, 2472-2481.
- McCormick, J.L., Mc Kee, T.C., Cardellina, J.H., Boyd, M.R. (1996). **HIV inhibitory natural products 26. Quinoline alkaloids from *Euodia roxburghiana*.** *Journal of Natural Products* 59, 469-471.
- McNeil, M., Darvill, A.G., Aman, P., Franzen, L.E., Albersheim, P. (1982). **Structural-analysis of complex carbohydrates using high-performance liquid-chromatography, gas-chromatography, and mass-spectrometry.** *Methods in Enzymology* 83, 3-45.
- Mchedlishvili, D., Kuchukashvili, Z., Tabatadze, T., Davitaia, G. (2005). **Influence of flavonoids isolated from *Satureja hortensis* L. on hypercholesterolemic rabbits.** *Indian Journal of Pharmacology* 37, 259-262.
- Medeiros, V.P., Queiroz, K.C.S., Cardoso, M.L., Monteiro, G.R.G., Oliveira, F.W., Chavante, S.F., Guimaraes, L.A., Rocha, H.A.O., Leite, E.L. (2008). **Sulfated galactofucan from *Lobophora variegata*: anticoagulant and anti-inflammatory properties.** *Biochemistry* 73, 1018-1024.
- Mellstra, S.T., Samuelss, G. (1973). **Phoratoxin, a toxic protein from Mistletoe *Phoradendron tomentosum* subsp. *macrophyllum* (Loranthaceae): improvements in isolation procedure and further studies on properties.** *European Journal of Biochemistry* 32, 143-147.
- Mendes, G.D., Soares, A.R., Martins, F.O., de Albuquerque, M.C.M., Costa, S.S., Yoneshigue-Valentin, Y., Gustinari, L.M.D., Santos, N., Romanos, M.T.V. (2010). **Antiviral activity of the green marine alga *Ulva fasciata* on the replication of human metapneumovirus.** *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* 52, 3-10.
- Meng, J., Sturgis, T.F., Youan, B.B.C. (2011). **Engineering tenofovir loaded chitosan nanoparticles to maximize microbicide mucoadhesion.** *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 44, 57-67.
- Meshkatalasadat, M.H., Shabaninejad, Y. (2011). **GC/MS analysis of volatile organic compounds of *Satureja bachtiarica* Bung using US-HS-SPME and nano scale injection techniques.** *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures* 6, 359-363.
- Meyer, J.J.M., Afolayan, A.J., Taylor, M.B., Engelbrecht, L. (1996). **Inhibition of herpes simplex virus type 1 by aqueous extracts from shoots of *Helichrysum aureonitens* (Asteraceae).** *Journal of Ethnopharmacology* 52, 41-43.
- Miao, B.C., Li, J., Fu, X.Y., Gan, L., Xin, X.L., Geng, M.Y. (2005). **Sulfated polymannuroguluronate, a novel anti-AIDS drug candidate, inhibits T cell apoptosis by combating oxidative damage of mitochondria.** *Molecular Pharmacology* 68, 1716-1727.

- Michaelakis, A., Theotokatos, S.A., Koliopoulos, G., Chorianopoulos, N.G. (2007). **Essential oils of *Satureja* species: insecticidal effect on *Culex pipiens* larvae (Diptera, Culicidae).** *Molecules* 12, 2567-2578.
- Mihajilov-Krstev, T., Radnovic, D., Kitic, D., Zlatkovic, B., Ristic, M., Brankovic, S. (2009). **Chemical composition and antimicrobial activity of *Satureja hortensis* L. essential oil.** *Central European Journal of Biology* 4, 411-416.
- Mihajilov-Krstev, T., Radnovic, D., Kitic, D., Stojanovic-Radic, Z., Zlatkovic, B. (2010). **Antimicrobial activity of *Satureja hortensis* L. essential oil against pathogenic microbial strains.** *Archives of Biological Sciences* 62, 159-166.
- Mihajilov-Krstev, T., Kitic, D., Radnovic, D., Ristic, M., Mihajlovic-Ukropina, M., Zlatkovic, B. (2011). **Chemical composition and antimicrobial activity of *Satureja kitaibelii* essential oil against pathogenic microbial strains.** *Natural Product Communications* 6, 1167-1172.
- Min, B., Lee, H., Lee, S., Kim, Y., Bae, K., Otake, T., Nakamura, N., Hattori, M. (2002). **Anti-human immunodeficiency virus-type 1 activity of constituents from *Juglans mandshurica*.** *Archives of Pharmacal Research* 25, 441-445.
- Miro, J.M., Sued, O., Plana, M., Pumarola, T. Gallart, T. (2004). **Advances in the diagnosis and treatment of acute human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection.** *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica* 22, 643-659.
- Mohammadpour, G., Marzony, E.T., Farahmand, M. (2012). **Evaluation of the anti-*Leishmania major* activity of *Satureja bakhtiarica* essential oil in vitro.** *Natural Product Communications* 7, 133-136.
- Momtaz, S., Abdollahi, M. (2010). **An update on pharmacology of *Satureja* species from antioxidant, antimicrobial, antidiabetes and anti-hyperlipidemic to reproductive stimulation.** *International Journal of Pharmacology* 6, 346-353.
- Mongelli, E., Martino, V., Coussio, J., Ciccia, G. (1996). **Screening of Argentine medicinal plants using the brine shrimp microwell cytotoxicity assay.** *International Journal of Pharmacognosy* 34, 249-254.
- Montaner, J.S.G., Gill, J., Singer, J., Raboud, J., Arseneau, R., Mc Lean, B.D., Schechter, M.T., Ruedy, J. (1996). **Double-blind placebo-controlled pilot trial of acemannan in advanced human immunodeficiency virus disease.** *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrome and Human Retrovirology* 12, 153-157.
- Montanha, J.A., Bourgougnon, N., Boustie, J., Amoros, M. (2009). **Antiviral activity of carrageenans from marine red algae.** *Latin American Journal of Pharmacy* 28, 443-448.
- Moreno, L., Bello, R., Beltrán, B., Calatayud, S., Primo-Yufera, E., Esplugues, J. (1998). **Pharmacological screening of different *Juniperus oxycedrus* L. extracts.** *Pharmacology & Toxicology* 82, 108-112.
- Morya, V.K., Kim, J., Kim, E.K. (2012). **Algal fucoidan: structural and size-dependent bioactivities and their perspectives.** *Applied Microbiology and Biotechnology* 93, 71-82.
- Moulard, M., Lortat-Jacob, H., Mondor, I., Roca, G., Wyatt, R., Sodroski, J., Lu, Z., Olson, W., Kwong, P.D., Sattentau, Q.J. (2000). **Selective interactions of polyanions with basic surfaces on human immunodeficiency virus type 1 gp120.** *Journal of Virology* 74, 1948-1960.

-
- Mouscadet, J.F., Tchertanov, L., Deprez, E. (2007). **HIV integrase: structure, and role in the HIV life cycle.** *Virologie* 11, S143-S152.
 - Mulholland, D.A., Mohammed, A.M.A., Coombes, P.H., Haque, S., Pohjala, L.L., Tammela, P.S.M., Crouch, N.R. (2011). **Triterpenoid acids and lactones from the leaves of *Fadogia tetraquetra* var. *tetraquetra* (Rubiaceae).** *Natural Product Communications* 6, 1573-1576.
 - Murphy, F.A., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Ghabrial, S.A., Jarvis, A.W., Martelli, G.P., Mayo, M.A., Summers, M.D. (1995). **Virus taxonomy: 6th report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.** *Archives of Virology* 141, 1-6.
 - Murray, P.K., Rosenthal, K.S., Pfaller, M.A. (2009). **Microbiología Médica**, 6ª ed., Ed. Elsevier, Madrid, España.
 - Muschietti, L., Martino, V., Ferraro, G., Coussio, J., Segura, L., Cartana, C., Cañigüeral, S., Adzet, T. (1996). **The antiinflammatory effect of some species from South America.** *Phytotherapy Research* 10, 84-86.
 - Nagorskaya, V.P., Reunov, A.V., Lapshina, L.A., Yermak, I.M., Barabanova, A.O. (2008). **Influence of κ/β -carrageenan from red alga *Tichocarpus crinitus* on development of local infection induced by tobacco mosaic virus in Xanthi-NC tobacco leaves.** *Biology Bulletin* 35, 310-314.
 - Nair, M.P., Kandaswami, C., Mahajan, S., Nair, H.N., Chawda, R., Shanahan, T., Schwartz, S.A. (2002). **Grape seed extract proanthocyanidins down-regulate HIV-1 entry correceptors CCR2b, CCR3 and CCR5 gene expression by normal peripheral blood mononuclear cells.** *Biological Research* 35, 421-431.
 - Nair, M.P.D., Padmaja, G., Moorthy, S.N. (2011). **Biodegradation of Cassava Starch factory residue using a combination of cellulases, xylanases and hemicellulases.** *Biomass & Bioenergy* 35, 1211-1218.
 - Nakashima, H., Kido, Y., Kobayashi, N., Motoki, Y., Neushul, M., Yamamoto, N. (1987). **Purification and characterization of an avian-myeloblastosis and human-immunodeficiency-virus reverse-transcriptase inhibitor, sulfated polysaccharides extracted from sea algae.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 31, 1524-1528.
 - Nakashima, H., Okubo, K., Honda, Y., Tamura, T., Matsuda, S., Yamamoto, N. (1989). **Inhibitory effect of glycosides like saponin from Soybean on the infectivity of HIV *in vitro*.** *AIDS* 3, 655-658.
 - Nakasugi, T., Komai, K. (1998). **Antimutagens in the Brazilian folk medicinal Carqueja (*Baccharis trimera* Less.).** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, 2560-2564.
 - Nance, C., Siwak, E., Shearer, W. (2009). **Preclinical development of the Green Tea catechin, epigallocatechin gallate, as an HIV-1 therapy.** *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 123, 459-465.
 - Naqash, S.Y., Nazeer, R.A. (2011). **Anticoagulant, antiherpetic and antibacterial activities of sulfated polysaccharide from Indian medicinal plant *Tridax procumbens* L. (Asteraceae).** *Applied Biochemistry and Biotechnology* 165, 902-912.
 - Nasr, N., Harman, A., Turville, S., Cunningham, A.L. (2014). **HIV Infection of Dendritic Cells**, In: "Human Retroviruses: Methods and Protocols", Ed. Springer Science-Business Media, Dordrecht, The Netherlands.
-

- Neff, C.P., Kurisu, T., Ndolo, T., Fox, K., Akkina, R. (2011). **A topical microbicide gel formulation of CCR5 antagonist maraviroc prevents HIV-1 vaginal transmission in humanized RAG-HU mice.** *PLoS One* 6, e-20209.
- Neil, S.J., Zang, T., Bieniasz, P.D. (2008). **Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu.** *Nature* 451, 425-430.
- Newman, D.J., Cragg, G.M. (2007). **Natural products as sources of new drugs over the last 25 years.** *Journal of Natural Products* 70, 461-477.
- Newsom-Davis, T.E., Wang, D., Steinman, L., Chen, P.F.T., Wang, L.X., Simon, A.K., Screaton, G.R. (2009). **Enhanced immune recognition of cryptic glycan markers in human tumours.** *Cancer Research* 69, 2018-2025.
- Ngo, L.T., Okogun, J.I., Fol, W.R. (2013). **21st century natural products research and drug development and traditional medicines.** *Natural Product Report* 30, 584-592.
- Nokta, M., Albrecht, T., Pollard, R. (1993). **Papaverine hydrochloride: effects on HIV replication and T-lymphocyte cell function.** *Immunopharmacology* 26, 181-185.
- Nonaka, G., Nishioka, I., Nishizawa, M., Yamagishi, T., Kashiwada, Y., Dutschman, G., Bodner, A., Kilkuskie, R., Cheng, Y., Lee, K. (1990). **Anti-AIDS agents 2. Inhibitory effects of tannins on HIV reverse transcriptase and HIV replication in H9 lymphocyte cells.** *Journal of Natural Products* 53, 587-595.
- Nosal' ova, G., Prisenznakova, L., Kost' alova, Z., Ebringerova, A., Hromadkova, Z. (2011). **Suppressive effect of pectic polysaccharides from *Cucurbita pepo* L. var. *styriaca* on citric acid-induced cough reflex in guinea pigs.** *Fitoterapia* 82, 357-364.
- Notka, F., Meier, G., Wagner, R. (2004). **Concerted inhibitory activities of *Phyllanthus amarus* on HIV replication *in vitro* and *ex vivo*.** *Antiviral Research* 64, 93-102.
- Nutan, N., Gupta, S.K. (2011). **Microbicides: a new hope for HIV prevention.** *Indian Journal of Medical Research* 134, 939-949.
- O' Keefe, B., Bvojdani, F., Buffa, V., Shattock, J., Montefiori, D.C., Bakke, J., Mirsalis, J., Dándrea, A., Bratcher, B., Saucedo, C.J., Mc Mahon, J.B., Pogue, G.P., Palmer, K.E. (2009). **Scaleable manufacture of HIV-1 entry inhibitor griffithsin and validation of its safety and efficacy as a topical microbicide component.** *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 106, 6099-6104.
- O' Shea, J.J., y J., K. (1997). Immunity: molecular and cellular basis of immunity. In: Klippel JH, (Atlanta, Ga: Arthritis Foundation;).
- Obiero, J., Mwethera, P.G., Wiysonge, C.S. Topical microbicides for prevention of sexually transmitted infections. Cochrane database of systematic reviews (Online) 6, CD007961-CD007961.
- Oblitas, E. (1992). **Plantas Medicinales de Bolivia**, Ed. Los Amigos del Libro, La Paz, Bolivia.
- Offergeld, R., Reinecker, C., Gumz, E., Schrum, S., Treiber, R., Neth, R.D., Gohla, S.H. (1992). **Mitogenic activity of high molecular polysaccharide fractions isolated from the Cupressaceae *Thuja occidentalis* L. enhanced cytokine production by thyapolsaccharide G fraction (TPSG).** *Leukemia* 6, S189-S191.

-
- Ogutcu, H., Sokmen, A., Sokmen, M., Polissiou, M., Serkedjieva, J., Daferera, D., Sahin, F., Baris, O., Gulluce, M. (2008). **Bioactivities of the various extracts and essential oils of *Salvia limbata* C.A. Meyer and *Salvia sclarea* L.** *Turkish Journal of Biology* 32, 181-192.
 - Ohta, Y., Lee, J.B., Hayashi, K., Hayashi, T. (2009). **Isolation of sulfated galactan from *Codium fragile* and its antiviral effect.** *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 32, 892-898.
 - Okeke, B.C., Lu, J. (2011). **Characterization of a defined cellulolytic and xylanolytic bacterial consortium for bioprocessing of cellulose and hemicelluloses.** *Applied Biochemistry and Biotechnology* 163, 869-881.
 - Omar, R.F., Bergeron, M.G. (2011). **The future of microbicides.** *International Journal of Infectious Diseases* 15, E656-E660.
 - Omidbaigi, R., Sefidkon, F., Kazemi, F. (2004). **Influence of drying methods on the essential oil content and composition of roman Chamomile.** *Flavour and Fragrance Journal* 19, 196-198.
 - Orhan, D.D., Kupeli, E., Yesilada, E., Ergun, F. (2006). **Anti-inflammatory and antinociceptive activity of flavonoids isolated from *Viscum album ssp album*.** *Zeitschrift fur Naturforschung C* 61, 26-30.
 - Orhan, I., Kartal, M., Kan, Y., Sener, B. (2008). **Activity of essential oils and individual components against acetyl and butyrylcholinesterase.** *Zeitschrift fur Naturforschung C* 63, 547-553.
 - Orhan, I.E., Ozcelik, B., Kan, Y., Kartal, M. (2011). **Inhibitory effects of various essential oils and individual components against extended-spectrum β -lactamase (ESBL) produced by *Klebsiella pneumoniae* and their chemical compositions.** *Journal of Food Science* 76, M538-M546.
 - Ownagh, A., Hasani, A., Mardani, K., Ebrahimzadeh, S. (2010). **Antifungal effects of thyme, Agastache and *Satureja* essential oils on *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* and *Fusarium solani*.** *Veterinary Research Forum* 1, 99-105.
 - Padian, S.N., der Straten, A., Ramjee, G., Chipato, T., De Bruyn, G., Blanchard, K., Shiboski, S., Montgomery, E.T., Fancher, H., Cheng, H., Rosenblum, M., Van der Laan, M., Jewell, N., McIntyre, J., The MIRA Team. (2007). **Diaphragm and lubricant gel for prevention of HIV acquisition in Southern African women: a randomised controlled trial.** *The Lancet* 37, 251-261.
 - Palomino, S.S., Abad, M.J., Bedoya, L.M., Garcia, J., Gonzales, E., Chiriboga, X., Bermejo, P., Alcamí, J. (2002). **Screening of South American plants against human immunodeficiency virus: Preliminary fractionation of aqueous extract from *Baccharis trinervis*.** *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 25, 1147-1150.
 - Pan, C., Lu, H., Qi, Z., Jiang, S. (2009). **Synergistic efficacy of combination of enfuvirtide and sifuvirtide, the first-and next- generation HIV-fusion inhibitors.** *AIDS* 23 (5), 639-641
 - Panizzi, L., Flamini, G., Cioni, P.L., Morelli, I. (1993). **Composition and antimicrobial properties of essential oils of 4 mediterranean Lamiaceae.** *Journal of Ethnopharmacology* 39, 167-170.
 - Parella, T., Nolis, P. (2005). **Spin-edited 2D HSQC-TOCSY experiments for the measurement of homonuclear and heteronuclear coupling constants:**
-

- Application to carbohydrates and peptides.** *Journal of Magnetic Resonance* 176, 15-26.
- Parikh, U.M., Dobard, C., Sharma, S., Cong, M.E., Jia, H., Martin, A., ., Pau, C.P., Hanson, D.L., Guenthner, P., Smith, J. (2009). **Complete protection from repeated vaginal simian-human immunodeficiency virus exposures in macaques by a topical gel containing tenofovir alone or with emtricitabine.** *Journal of Virology* 83, 10358–10365.
 - Parikh, U.M., Dobard, C., Sharma, S., Cong, M.-e., Jia, H., Martin, A., Pau, C.-P., Hanson, D.L., Guenthner, P., Smith, J., Kersh, E., Garcia-Lerma, J.G., Novembre, F.J., Otten, R., Folks, T., Heneine, W. (2009). **Complete protection from repeated vaginal simian-human immunodeficiency virus exposures in macaques by a topical gel containing Tenofovir alone or with emtricitabine.** *Journal of Virology* 83, 10358-10365.
 - Patsalo, V., Raleigh, D.P., Green, D.F. (2011). **Rational and computational design of stabilized variants of cyanovirin-N that retain affinity and specificity for glycan ligands.** *Biochemistry* 50, 10698-10712.
 - Paulsen, B.S. (2001). **Plant polysaccharides with immunostimulatory activities.** *Current Organic Chemistry* 5, 939-950.
 - Pawels, R., Balzarini, J., Baba, M., Snoeck, R., Schols, D., Herdewijn, P., Desmyter, J., De Clerq, E. (1988). **Rapid and automated tetrazolium-based colorimetric assay for the detection of anti-HIV compounds.** *Journal of Virological Methods* 20, 309-321.
 - Peng, Z.-g., Chen, H.-s., Guo, Z.-m., Dong, B., Tian, G.-y., Wang, G.-q. (2008). **Anti-HIV activities of *Achyranthes bidentata* polysaccharide sulfate in vitro and in vivo.** Yao xue xue bao = *Acta Pharmaceutica Sinica* 43, 702-706.
 - Pereira, B.M.R., da Silva, B.P., Pereira, N.A., Parente, J.P. (2000). **Anti-inflammatory and immunologically active polysaccharides of *Periandra mediterranea*.** *Phytochemistry* 54, 409-413.
 - Pereira, M.I., Ruthes, A.C., Carbonero, E.R., Marcon, R., Baggio, C.H., Freitas, C.S., Santos, A.R.S., Eliasaro, S., Sassaki, G.L., Gorin, P.A.J., Lacomini, M. (2010). **Chemical structure and selected biological properties of a glucomannan from the lichenized fungus *Heterodermia obscurata*.** *Phytochemistry* 71, 2132-2139.
 - Perez, F., Marin, E., Adzet, T. (1995). **The antiinflammatory effect of several compositae from south-america - extracts in rats.** *Phytotherapy Research* 9, 145-146.
 - Perez, R.M., Gallardo, Y.T. (2010). **Antioxidant and hepatoprotective effects of the methanol extract of the leaves of *Satureja macrostema*.** *Pharmacognosy Magazine* 6, 125-131.
 - Permanyer, M., Ballana, E., Este, J.A. (2010). **Endocytosis of HIV: anything goes.** *Trends in Microbiology* 18, 543-551.
 - Person, A.K., Hicks, C.B. (2012). **Pre-exposure prophylaxis - one more tool for HIV prevention.** *Current HIV Research* 10, 117-122
 - Petrerá, E., Coto, C.E. (2003). **Effect of meliacine, a plant derived antiviral, on tumor necrosis factor alpha.** *Fitoterapia* 74, 77-83.
 - Petrova, M.I., Mathys, L., Lebeer, S., Noppen, S., Van Damme, E.J.M., Tanaka, H., Igarashi, Y., Vaneechoutte, M., Vanderleyden, J., Balzarini, J. (2013). **Inhibition of**

- infection and transmission of HIV-1 and lack of significant impact on the vaginal commensal lactobacilli by carbohydrate-binding agents. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 68, 2026-2037
- Piacente, S., Pizza, C., deTommasi, N., Mahmood, N. (1996). **Constituents of *Ardisia japonica* and their in vitro anti-HIV activity.** *Journal of Natural Products* 59, 565-569.
 - Pieroni, A., Giusti, M.E., de Pasquale, C., Lenzarini, C., Censorii, E., Gonzales-Tejero, M.R., Sanchez-Rojas, C.P., Ramiro-Gutierrez, J.M., Skoula, M., Johnson, C., Sarpaki, A., Della, A., Paraskeva-Hadijchambi, D., Hadjichambis, A., Hmamouchi, M., El-Jorhi, S., El-Demerdash, M., El-Zayat, M., Al-Shahaby, O., Houmani, Z., Scherazed, M. (2006). **Circum-Mediterranean cultural heritage and medicinal plant uses in traditional animal healthcare: a field survey in eight selected areas within the RUBIA project.** *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* 24, 2-16.
 - Pillay, V., Mashigaidze, F., Choonara, Y.E., Du Toit, L.C., Buchmann, E., Maharaj, V., Ndesendo, V.M.K., Kumar, P. (2012). **Qualitative and quantitative intravaginal targeting: Key to anti-HIV-1 microbicide delivery from test tube to In Vivo success.** *Journal of Pharmaceutical Sciences* 101, 1950-1968.
 - Pinto, A., Martins, P.R., Romagnoli, G.G., Campanelli, A.P., Terezan, A.P., Rodrigues, E., da Eira, A.F., Kaneno, R. (2009). **Polysaccharide fraction of *Agaricus brasiliensis* avoids tumor-induced IL-10 production and changes the microenvironment of subcutaneous Ehrlich adenocarcinoma.** *Cellular Immunology* 256, 27-38.
 - Piras, A., Cocco, V., Falconieri, D., Porcedda, S., Marongiu, B., Maxia, A., Frau, M.A., Goncalves, M.J., Cavaleiro, C., Salgueiro, L. (2011). **Isolation of the volatile oil from *Satureja thymbra* by supercritical carbon dioxide extraction: chemical composition and biological activity.** *Natural Product Communications* 6, 1523-1526
 - Piret, J., Desormeaux, A., Bergeron, M.G. (2002). **Sodium lauryl sulfate, a microbicide effective against enveloped and nonenveloped viruses.** *Current Drug Targets* 3, 17-30.
 - Pirrone, V., Wigdahl, B., Krebs, F.C. (2011). **The rise and fall of polyanionic inhibitors of the human immunodeficiency virus type 1.** *Antiviral Research* 90, 168-182.
 - Pochet, S., Kansal, V., Destouesse, F., Sarfati, S. (1990). **Alkylglycoside carbonates of 3'-azido-3'-deoxythymidine** *Tetrahedron Letters* 31: 6021-6024.
 - Polansky, H., Itzkovitz, E. (2013) **Gene-Eden-VIR Is Antiviral: Results of a Post Marketing Clinical Study.** *Pharmacology and Pharmacy* 4, 1-8
 - Poli, A., Anzelmo, G., Nicolaus, B. (2010). **Bacterial Exopolysaccharides from Extreme Marine Habitats: Production, Characterization and Biological Activities.** *Marine Drugs* 8, 1779-1802
 - Pollard, M.A., Fischer, P., Windhab, E.J. (2011). **Characterization of galactomannans derived from legume endosperms of genus *Sesbania* (Fabaceae).** *Carbohydrate Polymers* 84, 550-559.
 - Ponath, P.D., Qin, S.X., Post, T.W., Wang, J., Wu, L., Gerard, N.P., Newman, W., Gerard, C., Mackay, C.R. (1996). **Molecular cloning and characterization of a human eotaxin receptor expressed selectively on eosinophils.** *Journal of Experimental Medicine* 183, 2437-2448.

- Prieto, A., Leal, J.A., Bernabe, M., Hawksworth, D.L. (2008). **A polysaccharide from *Lichina pygmaea* and *L. confinis* supports the recognition of Lichinomycetes.** *Mycological Research* 112, 381-388.
- Prieto, A., Leal, J.A., Gimenez-Abian, M.I., Canales, A., Jimenez-Barbero, J., Bernabe, M. (2007). **Isolation and structural determination of a unique polysaccharide containing mannofuranose from the cell wall of the fungus *Acrospermum compressum*.** *Glycoconjugate Journal* 24, 421-428.
- Pudney, J., Quayle, A., Anderson, D. (2005). **Immunological microenvironments in the human vagina and cervix: mediators of cellular immunity are concentrated in the cervical transformation zone.** *Biology of Reproduction* 73, 1253-1263.
- Pumarola, A., Rodriguez-Torres, A., García-Rodríguez, J., Piédrola-Angulo, G. (1995). **Microbiología y Parasitología Médica**, 2ª Ed (Salvat).
- QianCutrone, J.F., Huang, S., Trimble, J., Li, H., Lin, P.F., Alam, M., Klohr, S.E., Kadow, K.F. (1996). **Niruricide, a new HIV REV/RRE binding inhibitor from *Phyllanthus niruri*.** *Journal of Natural Products* 59, 196-199.
- Qiao, D.L., Luo, J.G., Ke, C.L., Sun, Y., Ye, H., Zeng, X.X. (2010). **Immunostimulatory activity of the polysaccharides from *Hyriopsis cumingii*.** *International Journal of Biological Macromolecules* 47, 676-680.
- Qing, Q., Wyman, C.E. (2011). **Hydrolysis of different chain length xylooligomers by cellulase and hemicellulase.** *Bioresource Technology* 102, 1359-1366.
- Queiroz, L.S., Nascimento, M.S., Cruz, A.K.M., Castro, A.J.G., Moura, M.D.V., Baseia, L.G., Araujo, R.M., Benevides, N.M.B., Lima, L.F.A., Leite, E.L. (2010). **Glucans from the *Caripia montagnei* mushroom present anti-inflammatory activity.** *International Immunopharmacology* 10, 34-42.
- Queirozneto, A., Melito, I. (1990). **Changes in sensitivity of the isolated guinea-pig vas-deferens induced by a lyophilized *Phoradendron-latifolium* leaf infusion.** *Journal of Ethnopharmacology* 28, 183-189.
- Rabanal, M., Ponce, N.M.A., Navarro, D.A., Gomez, R.M., Stortz, C.A. (2013). **The system of fucoidans from the brown seaweed *Dictyota dichotoma*: Chemical analysis and antiviral activity.** *Carbohydrate Polymers* 101, 804-811.
- Radonic, A., Milos, M. (2003). **Chemical composition and in vitro evaluation of antioxidant effect of free volatile compounds from *Satureja montana* L.** *Free Radical Research* 37, 673-679.
- Rafehi, H., Ververis, K., Karagiannis, T.C. (2012). **Mechanisms of action of phenolic compounds in olive.** *Journal of Dietary Supplements* 9, 96-109.
- Rahalison, L., Benathan, M., Monod, M., Frenk, E., Gupta, M.P., Solis, P.N., Fuzzati, N., Hostettmann, K. (1995). **Antifungal principles of *Baccharis-pedunculata*.** *Planta Medica* 61, 360-362.
- Ramjee, G. (2011). **Antiretroviral-based microbicides and oral pre-exposure prophylaxis for HIV prevention.** *Future Virology* 6, 997-1014.
- Raport, C.J., Gosling, J., Schweickart, V.L., Gray, P.W., Charo, I.F. (1996). **Molecular cloning and functional characterization of a novel human CC chemokine receptor (CCR5) for RANTES, MIP-1 beta, and MIP-1 alpha.** *Journal of Biological Chemistry* 271, 17161-17166.

- Rastegarpanah, M., Omidzohour, N., Vahedi, H., Malekzadeh, R., Hashemian, F., Safarnvadeh, T., Abdollahi, M. (2011). **Management of human ulcerative colitis by saturex : A randomized controlled trial.** *International Journal of Pharmacology* 7, 516-521.
- Ray, B., Hutterer, C., Bandyopadhyay, S.S., Ghosh, K., Chatterjee, U.R., Ray, S., Zeittraeger, I., Wagner, S., Marschall, M. (2013). **Chemically engineered sulfated glucans from rice bran exert strong antiviral activity at the stage of viral entry.** *Journal of Natural Products* 76, 2180-2188.
- Regueiro J, López C, González S, Martínez E. (2008). **Inmunología, Biología y Patología del Sistema Immune.** 3a ed. Madrid.
- Rerks-Ngarm, S., Pitisuttithum, P., Nitayaphan, S., Kaewkungwal, J., Chiu, J., Paris, R., Premisri, N., Namwat, C., de Souza, M., Adams, E., Benenson, M., Gurunathan, S., Tartaglia, J., McNeil, J.G., Francis, D.P., Stablein, D., Birx, D.L., Chunsuttiwat, S., Khamboonruang, C., Thongcharoen, P., Robb, M.L., Michael, N.L., Kunasol, P., Kim, J.H., Investigators., M.-T. (2009). **Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand.** *N Engl J Med* 361, 2209-2220.
- Reutrakul, V., Ningnuek, N., Pohmakotr, M., Yoosook, C., Napaswad, C., Kasisit, J., Santisuk, T., Tuchinda, P. (2007). **Anti HIV-1 flavonoid glycosides from *Ochna integerrima*.** *Planta Medica* 73, 683-688.
- Rezvanfar, M.A., Farshid, A.A., Sadrkhanlou, R.A., Ahmadi, A., Salehnia, A., Abdollahi, M. (2010). **Benefit of *Satureja khuzestanica* in subchronically rat model of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis.** *Experimental and Toxicologic Pathology* 62, 323-330
- Rezvanfar, M.A., Sadrkhanlou, R.A., Ahmadi, A., Shojaei-Sadee, H., Mohammadirad, A., Salehnia, A., Abdollahi, M. (2008). **Protection of cyclophosphamide-induced toxicity in reproductive tract histology, sperm characteristics, and DNA damage by an herbal source; evidence for role of free-radical toxic stress.** *Human & Experimental Toxicology* 27, 901-910.
- Rhimou, B., Hassane, R., Nathalie, B. (2010). **Antiviral activity of the extracts of Rhodophyceae from Morocco.** *African Journal of Biotechnology* 9, 7968-7975.
- Rios, J.L. (2011). **Chemical Constituents and Pharmacological Properties of *Poria cocos*.** *Planta Medica* 77, 681-691.
- Rios, M.Y., Salinas, D., Villarreal, M.L. (2001). **Cytotoxic activity of moronic acid and identification of the new triterpene 3,4-seco-olean-18-ene-3,28-dioic acid from *Phoradendron reichenbachianum*.** *Planta Medica* 67, 443-446.
- Rioux, L.E., Turgeon, S.L., Beaulieu, M. (2010). **Structural characterization of laminaran and galactofucan extracted from the brown seaweed *Saccharina longicuris*.** *Phytochemistry* 71, 1586-1595.
- Rivero-Cruz, I., Acevedo, L., Guerrero, J.A., Martinez, S., Bye, R., Pereda-Miranda, R., Franzblau, S., Timmermann, B.N., Mata, R. (2005). **Antimycobacterial agents from selected Mexican medicinal plants.** *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 57, 1117-1126.
- Roberst, L., Liebenberg, L., Barnabas, S., Passmore, J. (2012). **Vaginal microbicides to prevent human immunodeficiency virus infection in women: perspectives on the female genital tract, sexual maturity and mucosal inflammation.** *Best Practice & Research Clinical Obstetric and Gynaecology*, 26(4), 441-449

- Robert, P., Marquis, M., Barron, C., Guillon, F., Saulnier, L. (2005). **FT-IR investigation of cell wall polysaccharides from cereal grains. Arabinoxylan infrared assignment.** *Journal Agricultural and Food Chemistry* 53, 7014-7018.
- Roberts, C., Pfister, J., Spear, S. (2003). **Increasing proportion of herpes simplex virus type 1 as a cause of genital herpes infection in college students.** *Sexually Transmitted Diseases* 30, 797-800.
- Rodriguez, M.C., Merino, E.R., Pujol, C.A., Damonte, E.B., Cerezo, A.S., Matulewicz, M.C. (2005). **Galactans from cystocarpic plants of the red seaweed *Callophyllis variegata* (Kallymeniaceae, Gigartinales).** *Carbohydrate Research* 340, 2742-2751.
- Rohan, L.C., Moncla, B.J., Ayudhya, R.P.K.N., Cost, M., Huang, Y., Gai, F., Billitto, N., Lynam, J.D., Pryke, K., Graebing, P., Hopkins, N., Rooney, J.F., Friend, D., Dezzutti, C.S. (2010). **In vitro and ex vivo testing of Tenofovir shows it is effective as an HIV-1 microbicide.** *Plos One* 5(2),e9310
- Rohan, L.C., Yang, H., Wang, L. (2013). **Rectal pre-exposure prophylaxis (PrEP).** *Antiviral Research* 100, S17-S24.
- Rojas-Escudero, E., Alarcon-Jimenez, A.L., Elizalde-Galvan, P., Rojo-Callejas, F. (2004). **Optimization of carbohydrate silylation for gas chromatography.** *Journal of Chromatography A* 1027, 117-120.
- Romano, J., Malcolm, R.K., Garg, S., Rohan, L.C., Kaptur, P.E. (2008). **Microbicide delivery: Formulation technologies and strategies.** *Current Opinion in HIV and AIDS* 3, 558-566.
- Romero, R. (2008). **Microbiología y Parasitología Humana.** 3º ed. Ed Medica Panamericana
- Rose, D., Inglett, G. (2011). **A method for the determination of soluble arabinoxylan released from insoluble substrates by xylanases.** *Food Analytical Methods* 4, 66-72.
- Rukachaisirikul, V., Pailee, P., Hiranrat, A., Tuchinda, P., Yoosook, C., Kasisit, J., Taylor, W.C., Reutrakul, V. (2003). **Anti-HIV-1 protostane triterpenes and digeranylbenzophenone from trunk bark and stems of *Garcinia speciosa*.** *Planta Medica* 69, 1141-1146.
- Ryu, D.S., Kim, S.H., Oh, S.M., Lee, H.S., Jeong, J.H., Lee, D.S. (2011). **Immunosuppressive activities of water-soluble barley beta-glucan on alloantigen reactive cell proliferation and cytotoxicity.** *Food Science and Biotechnology* 20, 267-271.
- Sabzghabae, A.M., Davoodi, N., Ebadian, B., Aslani, A., Ghannadi, A. (2012). **Clinical evaluation of the essential oil of *Satureja hortensis* for the treatment of denture stomatitis.** *Dental Research Journal* 9, 198-202.
- Saha, S., Galhardi, L.C.F., Yamamoto, K.A., Linhares, R.E.C., Bandyopadhyay, S.S., Sinha, S., Nozawa, C., Ray, B. (2010). **Water-extracted polysaccharides from *Azadirachta indica* leaves structural features, chemical modification and anti-bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1) activity.** *International Journal of Biological Macromolecules* 47, 640-645.
- Saha, S., Nosal'ova, G., Ghosh, D., Fleskova, D., Capek, P., Ray, B. (2011). **Structural features and in vivo antitussive activity of the water extracted**

- polymer from *Glycyrrhiza glabra*. *International Journal of Biological Macromolecules* 48, 634-638.
- Saharkhiz, M.J., Zomorodian, K., Rezaei, M.R., Saadat, F., Rahimi, M.J. (2011). **Influence of growth phase on the essential oil composition and antimicrobial activities of *Satureja hortensis***. *Natural Product Communications* 6, 1173-1178.
 - Sakagami, H., Kawano, M., Thet, M.M., Hashimoto, K., Satoh, K., Kanamoto, T., Terakubo, S., Nakashima, H., Haishima, Y., Maeda, Y., Sakurai, K. (2011). **Anti-HIV and Immunomodulation Activities of Cacao Mass Lignin-Carbohydrate Complex**. *In Vivo* 25, 229-236.
 - Sakagami, H., Kushida, T., Oizumi, T., Nakashima, H., Makino, T. (2010). **Distribution of lignin-carbohydrate complex in plant kingdom and its functionality as alternative medicine**. *Pharmacology & Therapeutics* 128, 91-105.
 - Saklani, A., Kutty, S.K. (2008). **Plant-derived compounds in clinical trials**. *Drug Discovery Today* 13, 161-171.
 - Sakurai, M.H., Matsumoto, T., Kiyohara, H., Yamada, H. (1996). **Detection and tissue distribution of anti-ulcer pectic polysaccharides from *Bupleurum falcatum* by polyclonal antibody**. *Planta Medica* 62, 341-346.
 - Sakurai, N., Wu, J., Sashida, Y., Nikaido, T., Koike, K., Itokawa, H., Lee, K. (2004). **Anti AIDS Agents. Part 57: Actein, an anti HIV principle from the rhizome of *Cimifuga racemosa* (Black Cohosh), and the anti HIV activity of related saponins**. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 14, 1329-1332.
 - Samson, M., Stordeur, P., Labbe, O., Soularue, P., Vassart, G., Parmentier, M. (1996). **Molecular cloning and chromosomal mapping of a novel human gene, ChemR1, expressed in T lymphocytes and polymorphonuclear cells and encoding a putative chemokine receptor**. *European Journal of Immunology* 26, 3021-3028.
 - Samuelsen, A.B., Rieder, A., Grimmer, S., Michaelsen, T.E., Knutsen, S.H. (2011). **Immunomodulatory Activity of Dietary Fiber: Arabinoxylan and Mixed-Linked Beta-Glucan Isolated from Barley Show Modest Activities in Vitro**. *International Journal of Molecular Sciences* 12, 570-587.
 - Sanchez de Rojas, V.R., Somoza, B., Ortega, T., Villar del Fresno, A. (1996). **Isolation of vasodilatory active flavonoids from the traditional remedy *Satureja obovata***. *Planta Medica* 62, 272-274.
 - Sanchez de Rojas, V.R., Somoza, B., Ortega, T., Villar del Fresno, A.M. (1996). **Different mechanisms involved in the vasorelaxant effect of flavonoids isolated from *Satureja obovata***. *Planta Medica* 62, 554-556.
 - Sanchez Palomino, S., Abad, M.J., Bedoya, L.M., Garcia, J., Gonzales, E., Chiriboga, X., Bermejo, P., J., A. (2002). **Screening of South American Plants against human immunodeficiency virus: preliminary fractionation of aqueous extract from *Baccharis trinervis***. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 25, 1147-1150.
 - Sangma, C., Chuakheaw, D., Jongkon, N., Saenbandit, K., Nunrium, P., Uthayopas, P., Hannongbua, S. (2005). **Virtual Screening for Anti-HIV-1 RT and Anti-HIV-1 PR Inhibitors from the Thai Medicinal Plants Database: a Combined Docking with Neural Networks Approach**. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* 8, 417-429.

- Saravanakumar, G., Jo, D.G., Park, J.H. (2012). **Polysaccharide-Based Nanoparticles: A Versatile Platform for Drug Delivery and Biomedical Imaging.** *Current Medicinal Chemistry* 19, 3212-3229.
- Sariboga, B., Sariboga, N. (2011). **Antimicrobial Activity of Various Extracts of *Satureja spicigera*.** *Asian Journal of Chemistry* 23, 1867-1868.
- Savikin, K.P., Menkovic, N.R., Zdunic, G.M., Tasic, S.R., Ristic, M.S., Stevic, T.R., Dajic-Stevanovic, Z.P. (2010). **Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch., *M. dalmatica* Benth., and *Satureja cuneifolia* Ten. and Its Secretory Elements.** *Journal of Essential Oil Research* 22, 91-96.
- Schader, S., Schachter, J., Oliveira, M., Invemizzi, C., Wainberg, M. (2007). **Evaluation of different in vitro models to predict candidate HIV microbicide compound combination synergy.** In 14th CROI conference (Montreal, Canada).
- Schepetkin, I.A., Faulkner, C.L., Nelson-Overton, L.K., Wiley, J.A., Quinn, M.T. (2005). **Macrophage immunomodulatory activity of polysaccharides isolated from *Juniperus scopolorum*.** *International Immunopharmacology* 5, 1783-1799.
- Schepetkin, I.A., Xie, G., Kirpotina, L.N., Klein, R.A., Jutila, M.A., Quinn, M.T. (2008). **Macrophage immunomodulatory activity of polysaccharides isolated from *Opuntia polyacantha*.** *International Immunopharmacology* 8, 1455-1466.
- Schuitemaker, H., Koot, M., Kootstra, N.A., Dercksen, M.W., Degoede, R.E.Y., Vansteenkamp, R.P., Lange, J.M.A., Schattenkerk, J., Miedema, F., Tersmette, M. (1992). **Biological phenotype of human-immunodeficiency-virus type-1 clones at different stages of infection - progression of disease is associated with a shift from monocytotropic to t-cell-tropic virus populations** *Journal of Virology* 66, 1354-1360.
- Scordi-Bello, I.A., Mosoian, A., He, C.J., Chen, Y.B., Cheng, Y., Jarvis, G.A., Keller, M.J., Hogarty, K., Waller, D.P., Profy, A.T., Herold, B.C., Klotman, M.E. (2005). **Candidate sulfonated and sulfated topical microbicides: Comparison of anti-human immunodeficiency virus activities and mechanisms of action.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49, 3607-3615.
- Sefidkon, F., Jamzad, Z. (2004). **Essential oil composition of *Satureja spicigera* (C. Koch) Boiss. from Iran.** *Flavour and Fragrance Journal* 19, 571-573.
- Sefidkon, F., Jamzad, Z., Mirza, M. (2004). **Chemical variation in the essential oil of *Satureja sahendica* from Iran.** *Food Chemistry* 88, 325-328.
- Segarra, T., J., Fakioglu, E., Cheshenco, N., Wilson, S.S., Mesquita, P.M.M., Doncel, G.F., Herold, B.C. (2011). **Bridging the gap between preclinical and clinical microbicide trials: blind evaluation of candidate gels in murine models of efficacy and safety** *PLoS One* 6(11), e27675.
- Senatore, F., Soria, E.U., Soria, R.U., Della Porta, G., De Feo, V. (1998). **Essential oils from two peruvian *Satureja* species.** *Flavour and Fragrance Journal* 13, 1-4.
- Sendl, A., Chen, J.L., Jolad, S.D., Stoddart, C., Rozhon, E., Kernan, M., Nanakorn, W., Balick, M. (1996). **Two new naphthoquinones with antiviral activity from *Rhinacanthus nasutus*.** *Journal of Natural Products* 59, 808-811.
- Serrano, C., Matos, O., Teixeira, B., Ramos, C., Neng, N., Nogueira, J., Nunes, M.L., Marques, A. (2011). **Antioxidant and antimicrobial activity of *Satureja montana* L. extracts.** *Journal of the Science of Food and Agriculture* 91, 1554-1560.

- Shahab, A., Haghighati, F., Baeeri, M., Jamalifar, H., Abdollahi, M. (2011). **A clinical, microbiological and immunological comparison between subgingival irrigation with Dentol and chlorhexidine in advanced periodontitis.** *Archieve Medical Sciences* 7, 154-160.
- Shao, D., Dunlop, W.D., Lui, E.M.K., Bernards, M.A. (2008). **Immunostimulatory and anti-inflammatory polysaccharides from *Tripterygium wilfordii*: Comparison with organic extracts.** *Pharmaceutical Biology* 46, 8-15.
- Sharara, A., Perkins, D., Misukonis, M. (1997). **Interferon (INF)-alpha activation of human blood mononuclear cell *in vitro* e *in vivo* for nitric oxide synthase (NOS) type 2 mRNA and protein expression: posible relationship of induced NOS2 to the antihepatitis C effects of INF-alpha *in vivo*.** *Journal of Experimental Medicine* 186, 1495-1502.
- Shattock, R.J., Moore, J.P. (2003). **Inhibiting sexual transmission of HIV-1 infection.** *Nature Reviews Microbiology* 1, 25-34.
- Shattock, R.J., Rosenberg, Z. (2012). **Microbicides: topical prevention against HIV.** *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2(2), a007385.
- Shioda, T., Levy, J.A., Chengmayer, C. (1991). **Macrophage and t-cell line tropisms of hiv-1 are determined by specific regions of the envelope gp120 gene** *Nature* 349, 167-169.
- Silva, F.V.M., Martins, A., Salta, J., Neng, N.R., Nogueira, J.M.F., Mira, D., Gaspar, N., Justino, J., Grosso, C., Urieta, J.S., Palavra, A.M.S., Rauter, A.P. (2009). **Phytochemical profile and anticholinesterase and antimicrobial activities of supercritical versus conventional extracts of *Satureja montana*.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 11557-11563.
- Silva, J.A.D., Bomfim, R.R., Estevam, C.D., Antonioli, A.R., Araujo, A.A.D., Thomazzi, S.M. (2010). **Pharmacological properties of lichen *Cladonia clathrata*.** *Pharmaceutical Biology* 48, 745-752.
- Silva, M.R., Cavalcanti, R. y Reis, M.L. (1969). **Anti-inflammatory action of sulfated polysaccharides.** *Biochemical Pharmacology* 18, 1285-95
- Singh, I.P., Chauthi, S.K. (2011). **Small molecule HIV entry inhibitors: Part II. Attachment and fusion inhibitors: 2004-2010.** *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 21, 399-416.
- Siqueira, R.C.L., da Silva, M.S.J., de Alencar, D.B., Pires, A.D., de Alencar, N.M.N., Pereira, M.G., Cavada, B.S., Sampaio, A.H., Farias, W.R.L., Assreuy, A.M.S. (2011). **In vivo anti-inflammatory effect of a sulfated polysaccharide isolated from the marine brown algae *Lobophora variegata*.** *Pharmaceutical Biology* 49, 167-174.
- Skoler-Karpoof, S., Ramjee, G., Ahmed, K., Altini, L., Plagianos, M.G., Fledland, B., Govender, S., De Kock, A., Cassim, N., Palanee, T., Dozier, G., Maguire, R., Lahteenmaki, P. (2008). **Efficacy of carraguard for prevention of HIV infection in women in South Africa: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial.** *The Lancet* 372, 1977-1987.
- Smelcerovic, A., Knezevic-Jugovic, Z., Petronijevic, Z. (2008). **Microbial Polysaccharides and their Derivatives as Current and Prospective Pharmaceuticals.** *Current Pharmaceutical Design* 14, 3168-3195.
- Smith, J.H., Whiteside, A. (2010). **The history of AIDS exceptionalism.** *Journal of the International Aids Society* 13, 47.

- Song, G.L., Du, Q.Z. (2010). **Isolation of a polysaccharide with anticancer activity from *Auricularia polytricha* using high-speed countercurrent chromatography with an aqueous two-phase system.** Journal of Chromatography A 1217, 5930-5934.
- Spiller, H.A., Willias, D.B., Gorman, S.E., Sanftleban, J. (1996). **Retrospective study of mistletoe ingestion.** Journal of Toxicology-Clinical Toxicology 34, 405-408.
- Stanic, G., Samarzija, I. (1993). **Diuretic activity of *Satureja-montana* subsp *montana* extracts and oil in rats.** Phytotherapy Research 7, 363-366.
- Stein, G.M., Schietzel, M., Bussing, A. (1998). **Mistletoe in immunology and the clinic (short review).** Anticancer Research 18, 3247-3249.
- Strauss, J., Strauss, E. (2008). **Viruses and human disease**, 2^a Ed (Elsevier).
- Su, M.X., Li, Y.L., Leung, K.T., Cen, Y.Z., Li, T., Chen, R.Z., Ooi, V.E.C. (2006). **Antiviral activity and constituent of *Ardisia chinensis* Benth against coxsackie B3 virus.** Phytotherapy Research 20, 634-639.
- Suksamrarn, S., Panseeta, P., Kunchanawata, S., Distaporn, T., Ruktasing, S., Suksamrarn, A. (2006). **Ceanothane and Lupane type Triterpenes with Antiplasmodial and Antimycobacterial Activities from *Ziziphus cambodiana*.** Chemical and Pharmaceutical Bulletin 54, 535-537.
- Sullivan, R., Pantanowitz, L., Dezube, B. (2009). **Targeted therapy for kaposi sarcoma Biodrugs** 23, 69-75.
- Sullivan, R.J., Pantanowitz, L., Dezube, B.J. (2009). **Targeted Therapy for Kaposi Sarcoma.** Biodrugs 23, 69-75.
- Sun, H.X., Wang, H., Xu, H.S., Ni, Y. (2009). **Novel polysaccharide adjuvant from the roots of *Actinidia eriantha* with dual Th1 and Th2 potentiating activity.** Vaccine 27, 3984-3991.
- Sun, Y., Xu, R.J., Zhao, T.H., Fan, J.L., Hu, Q.H., Zeng, X.X. (2010). **Extraction, Purification and Antioxidant Activity in vitro of Polysaccharides from Kudingcha Made from *Ilex latifolia* Thunb.** Glycobiology 20, 169.
- Taghvaei, M., Naghibi, F., Mosaddegh, M., Moazzami, N., Ghorbani, A., Fakhari, A. (2009). **Prophage Induction in *Escherichia Coli* K-12(lambda) by Some Plants from Iran.** Studies on Ethno-Medicine 3, 57-59.
- Tanaka, R., Tsujii, H., Yamada, T., Kajimoto, T., Amano, F., Hasegawa, J., Hamashima, Y., Node, M., Katoh, K., Takebe, Y. (2009). **Novel 3a-Methoxyserrat-14-en-21b-ol (PJ-1) and 3b-Methoxyserrat-14-en-21b-ol (PJ-2)-Curcumin, Kojic Acid, Quercetin, and Baicalein Conjugates as HIV.** Agents Bioorganic & Medicinal Chemistry 17, 5238-5246.
- Tao, Y.Z., Zhang, L.N., Han, L., Zeng, F.B., Ding, K. (2009). **Studies on antitumor activity of a water-soluble hyperbranched polysaccharide and its sulfated derivatives.** Acta Polymerica Sinica, 852-859.
- Tariku, Y., Hymete, A., Hailu, A., Rohloff, J. (2010). **Essential-Oil Composition, Antileishmanial, and Toxicity Study of *Artemisia abyssinica* and *Satureja punctata* ssp *punctata* front Ethiopia.** Chemistry & Biodiversity 7, 1009-1018.
- Terris-Prestholt, F., Hanson, K., MacPhail, C., Vickerman, P., Rees, H., Watts, C. (2013). **How Much Demand for New HIV Prevention Technologies Can We Really Expect? Results from a Discrete Choice Experiment in South Africa.** Plos One 8.

- Tersmette, M., Degoede, R.E.Y., Al, B.J.M., Winkel, I.N., Gruters, R.A., Cuypers, H.T., Huisman, H.G., Miedema, F. (1988). **Differential syncytium-inducing capacity of human immunodeficiency virus isolates - frequent detection of syncytium-inducing isolates in patients with acquired immunodeficiency syndrome (aids) and aids-related complex.** *Journal of Virology* 62, 2026-2032.
- Tersmette, M., Lange, J.M.A., Degoede, R.E.Y., Dewolf, F., Eeftinkschattenkerk, J.K.M., Schellekens, P.T.A., Coutinho, R.A., Huisman, J.G., Goudsmit, J., Miedema, F. (1989). **Association between biological properties of human immunodeficiency virus variants and risk for aids and aids mortality.** *Lancet* 1, 983-985.
- Tian, L.M., Zhao, Y., Guo, C., Yang, X.B. (2011). **A comparative study on the antioxidant activities of an acidic polysaccharide and various solvent extracts derived from herbal *Houttuynia cordata*.** *Carbohydrate Polymers* 83, 537-544.
- Tillekeratne, L., Sherette, A., Grossman, P., Hupe, L., Hupe, D., R., H. (2001). **Simplified Catechin–Gallate Inhibitors of HIV–1 Reverse Transcriptase.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 11, 2762-2767.
- Tilton, J.C., Doms, R.W. (2010). **Entry inhibitors in the treatment of HIV-1 infection.** *Antiviral Research*. 85, 91-100.
- Tilton, J.C., Wilen, C.B., Didigu, C.A., Sinha, R., Harrison, J.E., Agrawal-Gamse, C., Henning, E.A., Bushman, F.D., Martin, J.N., Deeks, S.G., Doms, R.W. (2010). **A Maraviroc-Resistant HIV-1 with Narrow Cross-Resistance to Other CCR5 Antagonists Depends on both N-Terminal and Extracellular Loop Domains of Drug-Bound CCR5.** *Journal of Virology* 84, 10863-10876.
- Tobian, A.A.R., Quinn, T.C. (2009). **Herpes simplex virus type 2 and syphilis infections with HIV: an evolving synergy in transmission and prevention.** *Current Opinion in HIV and AIDS*. 4, 294-299.
- Tolo, F.M., Rukunga, G.W., Muli, F.W., Ochora, J.M., Irungu, B.N., Muthaura, C.N., Wanjiku, C.K., Mungai, G.M., Ngoc, Q., Hashimoto, K., Asakawa, Y. (2010). **The antiviral activity of compounds isolated from Kenyan *Carissa edulis* (Forssk.) Vahl.** *Journal of Medicinal Plants Research* 4, 1517-1522.
- Tortoriello, J., AguilarSantamaria, L. (1996). **Evaluation of the calcium-antagonist, antidiarrhoeic and central nervous system activities of *Baccharis serraefolia*.** *Journal of Ethnopharmacology* 53, 157-163.
- Trincherro, J., Ponce, N.M.A., Cordoba, O.L., Flores, M.L., Pampuro, S., Stortz, C.A., Salomon, H., Turk, G. (2009). **Antiretroviral Activity of Fucoidans Extracted from the Brown Seaweed *Adenocystis utricularis*.** *Phytotherapy Research* 23, 707-712
- Tutin, T., Heywood, V., Burges, N. (1993). **Flora Europaea**, Vol Vol. II (UK, Cambridge University Press).
- Tzakou, O., Skaltsa, H. (2003). Composition and antibacterial activity of the essential oil of *Satureja parnassica* subsp *parnassica*. *Planta Medica* 69, 282-284
- Tziveleka, L., Vagias, C., Roussis, V. (2003). **Natural Products with Anti–HIV Activity from Marine Organisms.** *Current Topics in Medicinal Chemistry* 3, 1512-1535.
- Ukai, S., Kiho, T., Hara, C., Kuruma, I., Tanaka, Y. (1983). **Polysaccharides in fungi .14. Anti-inflammatory effect of the polysaccharides from the fruit bodies of several fungi.** *Journal of Pharmacobio-Dynamics* 6, 983-990.

- Usuga, X., Ruiz, Y., Julio Montoya, C., Teresa Rugeles, M. (2009). **Role of the Regulatory and Accessory Proteins of HIV-1 in its Pathogenesis.** *Acta Biologica Colombiana* 14, 3-17.
- Van Herrewege, Y., Morellato, L., Descours, A., Aerts, L., Michiels, J., Heyndrickx, L., Martin, L., Vanham, G. (2008). **CD4 mimetic miniproteins: potent anti-HIV compounds with promising activity as microbicides.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 61, 818-826.
- Vandekerckhove, L., Christ, F., Van Maele, B., De Rijck, J., Gijsbers, R., Van den Haute, C., Witvrouw, M., Debyser, Z. (2006). **Transient and stable knockdown of the integrase cofactor LEDGF/p75 reveals its role in the replication cycle of human immunodeficiency virus.** *Journal of Virology* 80, 1886-1896.
- Vanriper, G., Siciliano, S., Fischer, P.A., Meurer, R., Springer, M.S., Rosen, H. (1993). **Characterization and species distribution of high-affinity gtp-coupled receptors for human rantes and monocyte chemoattractant protein-1.** *Journal of Experimental Medicine* 177, 851-856.
- Varela, B.G., Fernandez, T., Ricco, R.A., Zolezzi, P.C., Hajos, S.E., Gurni, A.A., Alvarez, E., Wagner, M.L. (2004). **Phoradendron liga (Gill. ex H. et A.) Eichl. (Viscaceae) used in folk medicine: anatomical, phytochemical, and immunochemical studies.** *Journal of Ethnopharmacology* 94, 109-116.
- Vasconcellos, C.L.C., Vitorio, K.C.D., Andrade, P.A., Cambui, E.V.F., Lira, A.F., Cavalcante, S.C.H., Estevam, C.S., Antonioli, A.R., Thomazzi, S.M. (2009). **Antinociceptive, anti-inflammatory, and antioxidant properties of Phoradendron piperoides leaves.** *Pharmaceutical Biology* 47, 645-652.
- Vaz, J.A., Barros, L., Martins, A., Santos-Buelga, C., Vasconcelos, M.H., Ferreira, I. (2011). **Chemical composition of wild edible mushrooms and antioxidant properties of their water soluble polysaccharidic and ethanolic fractions.** *Food Chemistry* 126, 610-616
- Vazquez de Aldana, B.R., García-Ciudad, A., García-Criado, B. (2009). **Relación entre compuestos fenólicos y calidad nutritiva en especies pratenses.** *In* La multifuncionalidad de los pastos: producción ganadera sostenible y gestión de los ecosistemas, R. Reine, O. Barrantes, A. Broca, and C. Ferrer, eds. (Huesca, Sociedad Española para el estudio de los pastos), pp. 273-278.
- Veenashri, B.R., Muralikrishna, G. (2011). **In vitro anti-oxidant activity of xylo-oligosaccharides derived from cereal and millet brans - A comparative study.** *Food Chemistry* 126, 1475-1481.
- Vera, J., Castro, J., Gonzalez, A., Barrientos, H., Matsuhira, B., Arce, P., Zuniga, G., Moenne, A. (2011). **Long-term protection against tobacco mosaic virus induced by the marine alga oligo-sulphated-galactan Poly-Ga in tobacco plants.** *Molecular Plant Pathology* 12, 437-447.
- Verjans, G.M.G.M., Heiligenhaus, A. (2011). **Herpes Simplex Virus-Induced Ocular Diseases: Detrimental Interaction Between Virus and Host.** *Current Immunology Reviews* 7, 310-327.
- Vermeire, K., Brouwers, J., Van Herrewege, Y., Le Grand, R., Vanham, G., Augustijns, P., Bell, T.W., Schols, D. (2008). **CADA, a potential anti-HIV microbicide that specifically targets the cellular CD4 receptor.** *Current HIV Research* 6, 246-256.

- Vidic, D., Cavar, S., Maksimovic, M. (2010). **Antioxidant activity of two *Satureja* species.** *Planta Medica* 76, 1227-1227.
- Vignon, M.R., Heux, L., Malainine, M.E., Mahrouz, M. (2004). **Arabinan-cellulose composite in *Opuntia ficus-indica* prickly pear spines.** *Carbohydrate Research* 339, 123-131.
- Vimalanathan, S., Ignacimuthu, S., Hudson, J.B. (2009). **Medicinal plants of Tamil Nadu (Southern India) are a rich source of antiviral activities.** *Pharmaceutical Biology* 47, 422-429.
- Viturro, C.I., Molina, A., Guy, I., Charles, B., Guinaudeau, H., Fournet, A. (2000). **Essential oils of *Satureja boliviana* and *S.parvifolia* growing in the region of Jujuy, Argentina.** *Flavour and Fragrance Journal* 15, 377-382.
- Vlieghe, P., Clerc, T., Pannecouque, C., Witvrouw, M., De Clercq, E., Salles, J.P., Kraus, J.L., (2002). **Synthesis of new covalently bound kappa-carrageenan-AZT conjugates with improved anti-HIV activities.** *Journal of Medicinal and Chemistry* 45, 1275-1283.
- Vlietinck, A.J., De Bruyne, T., Apers, S., Pieters, L.A. (1998). **Plant-derived leading compounds for chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) infection.** *Planta Medica* 64, 97-109.
- Vo, T.S., Kim, S.K. (2010). **Potential Anti-HIV Agents from Marine Resources: An Overview.** *Marine Drugs* 8, 2871-2892.
- W., Y.-l., Jing, A., Jing-ming, Z., Bing, X., Xiao-jie, X., Mei-yu, G., Xian-liang, X., Han-dong, J. (2011). **Sulfated polymannuroguluronate inhibits Tat-induced SLK cell adhesion via a novel binding site, a KKR spatial triad.** *Acta Pharmacologica Sinica* 32, 647-654.
- Wakabi, W. (2007). Global health agencies agree to HIV/AIDS partnership.
- Wang, C.D., Duan, Y. (2008). **Binding modes of CCR5 targeting HIV entry inhibitors: Partial and full antagonism.** *Journal of Molecular Graphics and Modelling* 26, 1287-1295.
- Wang, B. (2011). **Chemical characterization and Ameliorating effect of polysaccharide from Chinese jujube on intestine oxidative injury by ischemia and reperfusion.** *International Journal of Biological Macromolecules* 48, 386-391.
- Wang, H., Ooi, E.V., Ang, P.O. (2007). **Antiviral polysaccharides isolated from Hong Kong brown seaweed *Hydroclathrus clathratus*.** *Science in China Series C-Life Sciences* 50, 611-618.
- Wang, H., Ooi, V.E.C., Ang, P.O. (2010a). **Anti-herpesviral property and mode of action of a polysaccharide from brown seaweed (*Hydroclathrus clathratus*).** *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 26, 1703-1713.
- Wang, H.X., Ng, T.B. (2001). **Examination of lectins, polysaccharopeptide, polysaccharide, alkaloid, coumarin and trypsin inhibitors for inhibitory activity against human immunodeficiency virus reverse transcriptase and glycohydrolases.** *Planta Medica* 67, 669-672.
- Wang, J.M., Hu, Y.L., Wang, D.Y., Zhang, F., Zhao, X.N., Abula, S., Fan, Y.P., Guo, L.W. (2010). ***Lycium barbarum* polysaccharide inhibits the infectivity of Newcastle disease virus to chicken embryo fibroblast.** *International Journal of Biological Macromolecules* 46, 212-216.

- Wang, S.C., Bligh, S.W.A., Shi, S.S., Wang, Z., Hu, Z.B., Crowder, J., Branford-White, C., Vella, C. (2007a). **Structural features and anti-HIV-1 activity of novel polysaccharides from red algae *Grateloupia longifolia* and *Grateloupiafilicina*.** *International Journal of Biological Macromolecules* 41, 369-375.
- Wang, S.C., Bligh, S.W.A., Zhu, C.L., Shi, S.S., Wang, Z.T., Hu, Z.B., Crowder, J., Branford-White, C., Vella, C. (2008). **Sulfated beta-glucan derived from oat bran with potent anti-HIV activity.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 2624-2629
- Wang, W., Zhang, P., Hao, C., Zhang, X.-E., Cui, Z.-Q., Guan, H.-S. (2011). **In vitro inhibitory effect of carrageenan oligosaccharide on influenza A H1N1 virus.** *Antiviral Research* 92, 237-246.
- Warrilow, D., Gardner, J., Darnell, G., Suhrbier, A., Harrich, D. (2006). **HIV Type 1 Inhibition by Protein Kinase C Modulatory Compounds.** *AIDS Research and Human Retroviruses* 22, 854-864.
- Westereng, B., Michaelsen, T.E., Samuelsen, A.B., Knutsen, S.H. (2008). **Effects of extraction conditions on the chemical structure and biological activity of white cabbage pectin.** *Carbohydrate Polymers* 72, 32-42.
- Wijesekara, I., Pangestuti, R., Kim, S.K. (2011). **Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae.** *Carbohydrate Polymers* 84, 14-21
- Wijesinghe, W.A.J.P., Jeon, Y.-J. (2012). **Biological activities and potential industrial applications of fucose rich sulfated polysaccharides and fucoidans isolated from brown seaweeds: A review.** *Carbohydrate Polymers* 88, 13-20.
- Wilen, C.B., Tilton, J.C., Doms, R.W. (2012). **Molecular mechanisms of HIV entry.** *Advances in Experimental Medicine and Biology* 726, 223-242.
- Williamson, M., Mc Cormick, T., Nance, C., Shearer, W. (2006). **Epigallocatechin Gallate, the Main Polyphenol in Green Tea, Binds to the T-Cell Receptor CD4: Potential for HIV-1 Therapy** *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 118, 1369-1374.
- Wira, C., Fahley, J., Sentman, C., Pioli, P., Shen, L. (2005). **Innate and adaptive immunity in female genital tract: cellular response and interactions.** *Immunological Reviews* 206, 206-306.
- Witvrow, M., Esté, J., Mateu, M., Reymen, D., Andrei, R., Snoeck, R., Ikeda, S., Pauwels, R., Bianchini, N., Desmyter, J., De Clercq, E. (1994). **Activity of sulphated polysaccharide extracted from the red seaweed *Aghardiella tenera* against human immunodeficiency virus and other enveloped viruses** *Antiviral Chemistry andd Chemotherapy* 5, 297-303.
- Won, D.P., Lee, J.S., Kwon, D.S., Lee, K.E., Shin, W.C., Hong, E.K. (2011). **Immunostimulating activity by polysaccharides isolated from fruiting body of *Inonotus obliquus*.** *Molecules and Cells* 31, 165-173.
- Wong, J.H., Ng, T.B. (2003). **Purification of a trypsin-stable lectin with antiproliferative and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activity.** *Biochemical and Biophysical Research Communications* 301, 545-550.
- Wu, D.M., Duan, W.Q., Liu, Y., Cen, Y. (2010). **Anti-inflammatory effect of the polysaccharides of Golden needle mushroom in burned rats.** *International Journal of Biological Macromolecules* 46, 100-103.

- Wu, H., Myszka, D.G., Tendian, S.W., Brouillette, C.G., Sweet, R.W., Chaiken, I.M., Hendrickson, W.A. (1996). **Kinetic and structural analysis of mutant CD4 receptors that are defective in HIV gp120 binding.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 15030-15035.
- Wu, M.B., Wu, Y.L., Zhou, J., Pan, Y.J. (2009). **Structural characterisation of a water-soluble polysaccharide with high branches from the leaves of *Taxus chinensis* var. *mairei*.** *Food Chemistry* 113, 1020-1024.
- Wu, Y.C., Hung, Y.C., Chang, F.R., Cosentino, M., Wang, H.K., Lee, K.H. (1996). **Identification of ent-16 beta,17-dihydroxykauran-19-oic acid as an anti-HIV principle and isolation of the new diterpenoids annosquamosins A and B from *Annona squamosa*.** *Journal of Natural Products* 59, 635-637.
- Wu, Y.-l., Ai, J., Zhao, J.-m., Xiong, B., Xin, X.-j., Geng, M.-y., Xin, X.-l., Jiang, H.-d. (2011). **Sulfated polymannuroguluronate inhibits Tat-induced SLK cell adhesion via a novel binding site, a KKR spatial triad.** *Acta Pharmacologica Sinica* 32, 647-654.
- Wu, Z., Pan, D.-d., Guo, Y., Zeng, X. (2013). **Structure and anti-inflammatory capacity of peptidoglycan from *Lactobacillus acidophilus* in RAW-264.7 cells.** *Carbohydrate Polymers* 96, 466-473.
- Xia, Y.G., Kuang, H.X., Yang, B.Y., Wang, Q.H., Liang, J., Sun, Y.P., Wang, Y.H. (2010). **Optimum extraction of acidic polysaccharides from the stems of *Ephedra sinica* Stapf by Box-Behnken statistical design and its anti-complement activity.** *Carbohydrate Polymers* 84, 282-291.
- Xia, Y.G., Wang, Q.H., Liang, J., Yang, B.Y., Li, G.Y., Kuang, H.X. (2010). **Development and Application of a Rapid and Efficient CZE Method Coupled with Correction Factors for Determination of Monosaccharide Composition of Acidic Hetero-polysaccharides from *Ephedra sinica*.** *Phytochemical Analysis* 22, 103-111.
- Xiao, F., Sheng, L., Cheng, Z., Yong, Y., Jian, S. (2010). **Minor New Constituents from *Heteroplexis microcephala*.** *Acta Pharmaceutica Sinica* 45, 82-86.
- Xie, G., Schepetkin, I.A., Quinn, M.T. (2007). **Immunomodulatory activity of acidic polysaccharides isolated from *Tanacetum vulgare* L.** *International Immunopharmacology* 7, 1639-1650.
- Xie, G., Schepetkin, I.A., Siemsen, D.W., Kirpotina, L.N., Wiley, J.A., Quinn, M.T. (2008). **Fractionation and characterization of biologically-active polysaccharides from *Artemisia tripartita*.** *Phytochemistry* 69, 1359-1371.
- Xu, H.X., Zeng, F.Q., Wan, M., Sim, K.Y. (1996). **Anti-HIV triterpene acids from *Geum japonicum*.** *Journal of Natural Products* 59, 643-645.
- Xu, Y.X., Dong, Q., Qiu, H., Cong, R.H., Ding, K. (2010). **Structural Characterization of an Arabinogalactan from *Platycodon grandiflorum* Roots and Antiangiogenic Activity of Its Sulfated Derivative.** *Biomacromolecules* 11, 2558-2566.
- Xu, Z.Q., Barrow, W.W., Suling, W.J., Westbrook, L., Barrow, E., Lin, Y.M., Flavin, M.T. (2004). **Anti-HIV natural product (+)-calanolide A is active against both drug-susceptible and drug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 12, 1199-1207.
- Xu, Z.Q., Kern, E.R., Westbrook, L., Allen, L.B., Buckheit, R.W., Tseng, C.K.H., Jenta, T., Flavin, M.T. (2000). **Plant-derived and semi-synthetic calanolide compounds**

- with in vitro activity against both human immunodeficiency virus type 1 and human cytomegalovirus. *Antiviral Chemistry & Chemotherapy* 11, 23-29.
- Xu, Z.T., Chen, X.U., Zhong, Z.F., Chen, L.D., Wang, Y.T. (2011). **Ganoderma lucidum Polysaccharides: Immunomodulation and Potential Anti-Tumor Activities.** *American Journal of Chinese Medicine* 39, 15-27.
 - Xue, H., Lu, X., Zheng, P., Liu, L., Han, C., Hu, J., Liu, Z., Ma, T., Li, Y., Wang, L., Chen, Z., Liu, G. (2010). **Highly Suppressing Wild-Type HIV-1 and Y181C Mutant HIV-1 Strains by 10-Chloromethyl-11-demethyl-12-oxo-calanolide A with Druggable Profile.** *Journal of Medicinal Chemistry* 53, 1397-1401.
 - Yamada, H., Kiyohara, H., Cyong, J.C., Takemoto, N., Komatsu, Y., Kawamura, H., Aburada, M., Hosoya, E. (1990). **Studies on immunologically active substances from Kampo medicine juzen-taiho-to .1. Fractionation and characterization of mitogenic and anticomplementary active fractions from Kampo (japanese herbal) medicine “juzen-taiho-to”.** *Planta Medica* 56, 386-391.
 - Yamada, H., Ra, K.S., Kiyohara, H., Cyong, J.C., Otsuka, Y. (1989). **Structural characterization of an anti-complementary pectic polysaccharide from the roots of *Bupleurum-falcatum* L.** *Carbohydrate Research* 189, 209-226.
 - Yamada, H., Sun, X.B., Matsumoto, T., Ra, K.S., Hirano, M., Kiyohara, H. (1991). **Purification of antiulcer polysaccharides from the roots of *Bupleurum-falcatum*.** *Planta Medica* 57, 555-559.
 - Yamada, K., Ogawa, H., Hara, A., Yoshida, Y., Yonezawa, Y., Karibe, K., Nghia, V.B., Yoshimura, H., Yamamoto, Y., Yamada, M., Nakamura, K., Imai, K. (2009). **Mechanism of the antiviral effect of hydroxytyrosol on influenza virus appears to involve morphological change of the virus.** *Antiviral Research* 83, 35-44.
 - Yamasaki, K., Nakano, M., Kawahata, T., Mori, H., Otake, T., Ueba, N., Oishi, I., Inami, R., Yamane, M., Nakamura, M., Murata, H., Nakanishi, T. (1998). **Anti-HIV-1 activity of herbs in Labiatae.** *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 21, 829-833.
 - Yang, G., Qi, J., Cheng, K., Hu, C. (2007). **Anti-HIV Chemical Constituents of Aerial Parts of *Caragana rosea*.** *Acta Pharmaceutica Sinica* 42, 179-182.
 - Yan-lin, W., Jing, A., Jing-ming, Z., Bing, X., Xiao-jie, X., Mei-yu, G., Xian-liang, X., Han-dong, J. (2011). **Sulfated polymannuroguluronate inhibits Tat-induced SLK cell adhesion via a novel binding site, a KKR spatial triad.** *Acta Pharmacologica Sinica* 32, 647-654.
 - Yesilada, E., Gurbuz, I., Ergun, E. (1997). **Effects of *Cistus laurifolius* L. flowers on gastric and duodenal lesions.** *Journal of Ethnopharmacology* 55, 201-211.
 - Yi, L., Li, Z.Q., Yuan, K.H., Qu, X.X., Chen, J., Wang, G.W., Zhang, H., Luo, H.P., Zhu, L.L., Jiang, P.F., Chen, L.R., Shen, Y., Luo, M., Zuo, G.Y., Hu, J.H., Duan, D.L., Nie, Y.C., Shi, X.L., Wang, W., Han, Y., Li, T.S., Liu, Y.Q., Ding, M.X., Deng, H.K., Xu, X.J. (2004). **Small molecules blocking the entry of severe acute respiratory syndrome coronavirus into host cells.** *Journal of Virology* 78, 11334-11339.
 - Yin, Y., Yu, R.M., Yang, W., Yuan, F., Yan, C.Y., Song, L.Y. (2010). **Structural characterization and anti-tumor activity of a novel heteropolysaccharide isolated from *Taxus yunnanensis*.** *Carbohydrate Polymers* 82, 543-548.
 - Youngken, W. (1951). *Tratado de Farmacognosia* (Mexico D.F.).

- Yu, R.M., Yang, W., Song, L.Y., Yan, C.Y., Zhang, Z., Zhao, Y. (2007). **Structural characterization and antioxidant activity of a polysaccharide from the fruiting bodies of cultured *Cordyceps militaris***. *Carbohydrate Polymers* 70, 430-436.
- Yu, Y., Miyashiro, H., Nakamura, N., Hattori, M., Parck, J. (2007B). **Effects of Triterpenoids and Flavonoids Isolated from *Alnus firma* on HIV-1 Viral Enzymes**. *Archives of Pharmacal Research* 30, 820-826.
- Yuan, C.F., Wang, C.D., Bu, Y.Q., Xiang, T.X., Huang, X.N., Wang, Z.W., Yi, F.P., Ren, G.S., Liu, G.L., Song, F.Z. (2010). **Antioxidative and immunoprotective effects of *Pyracantha fortuneana* (Maxim.) Li polysaccharides in mice**. *Immunology Letters* 133, 14-18.
- Yucel, N., Aslim, B. (2010). **Antibacterial activity of the essential oil of *Satureja wiedemanniana* against *Bacillus* species isolated from chicken meat**. *Foodborne Pathogens and Disease* 8, 71-76.
- Yucharoen, R., Chansakaow, S., Tragoolpua, Y. (2011). **Inhibitory effect of aromatic herbs, lavender, sage and chamomile against herpes simplex virus infection**. *African Journal of Biotechnology* 10, 15394-15401.
- Zani, F., Massimo, G., Benvenuti, S., Bianchi, A., Albasini, A., Melegari, M., Vampa, G., Bellotti, A., Mazza, P. (1991). **Studies on the genotoxic properties of essential oils with *bacillus-subtilis* rec-assay and *salmonella* microsome reversion assay**. *Planta Medica* 57, 237-241.
- Zarrin, M., Amirrajab, N., Sadeghi-Nejad, B. (2010). **In vitro antifungal activity of *Satureja Khuzestanica* Jamzad against *Cryptococcus neoformans***. *Pakistan Journal of Medical Sciences* 26, 880-882.
- Zavatti, M., Zanolli, P., Benelli, A., Rivasi, M., Baraldi, C., Baraldi, M. (2010). **Experimental study on *Satureja montana* as a treatment for premature ejaculation**. *Journal of Ethnopharmacology* 133, 629-633.
- Zhang, A.L., Lu, J.H., Zhang, N., Zheng, D., Zhang, G.R., Teng, L.R. (2010). **Extraction, Purification and Anti-tumor Activity of Polysaccharide from Mycelium of Mutant *Cordyceps militaris***. *Chemical Research in Chinese Universities* 26, 798-802.
- Zhang, H., Ye, L., Wang, K.W. (2010). **Structural characterization and anti-inflammatory activity of two water-soluble polysaccharides from *Bellamyia purificata***. *Carbohydrate Polymers* 81, 953-960.
- Zhang, M., Zhu, L., Cui, S.W., Wang, Q., Zhou, T., Shen, H.S. (2010). **Fractionation, partial characterization and bioactivity of water-soluble polysaccharides and polysaccharide-protein complexes from *Pleurotus geesteranus***. *International Journal of Biological Macromolecules* 48, 5-12.
- Zhang, S., Kawakami, K. (2010). **One-step preparation of chitosan solid nanoparticles by electrospray deposition**. *International Journal of Pharmaceutics* 397, 211-217.
- Zhang, Y., But, P.P.-H., Xu, H.-X., Delaney, G.D., Lee, S.H.S., Lee, S.F. (2007). **Chemical properties, mode of action, and in vivo anti-herpes activities of a lignin-carbohydrate complex from *Prunella vulgaris***. 75, 242-249.
- Zhang, Y.L., Lu, X.Y., Fu, Z.B., Wang, Z.B., Zhang, J.B. (2011). **Sulphated modification of a polysaccharide obtained from fresh persimmon (*Diospyros***

- kaki L.) fruit and antioxidant activities of the sulphated derivatives.** *Food Chemistry* 127, 1084-1090.
- Zhang, Y.W., Kiyohara, H., Matsumoto, T., Yamada, H. (1997). **Fractionation and chemical properties of immunomodulating polysaccharides from roots of *Dipsocus asperoides*.** *Planta Medica* 63, 393-399.
 - Zhao, J.F., Kiyohara, H., Matsumoto, T., Yamada, H. (1993). **Anticomplementary acidic polysaccharides from roots of *Lithospermum-euchromum*.** *Phytochemistry* 34, 719-724.
 - Zhao, Y., Jiang, F., Liu, P., Chen, W., Yi, K. **Catechins containing a galloyl moiety as potential anti-HIV-1 compounds.** *Drug Discovery Today* 17, 630-635.
 - Zhu, W., Chiu, L.C.M., Ooi, V.E.C., Chan, P.K.S., Ang, P.O., Jr. (2006). **Antiviral property and mechanisms of a sulphated polysaccharide from the brown alga *Sargassum patens* against Herpes simplex virus type 1.** *Phytomedicine* 13, 695-701.
 - Zhuang, C., Itoh, H., Mizuno, T., Ito, H. (1995). **Antitumor active fucoidan from the brown seaweed, umitoranoo (*sargassum-thunbergii*).** *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 59, 563-567.
 - Zibaei, M., Sarlak, A., Delfan, B., Ezatpour, B., Azargoon, A. (2012). **Scolicidal Effects of *Olea europaea* and *Satureja khuzestanica* Extracts on Protoscolices of Hydatid Cysts.** *Korean Journal of Parasitology* 50, 53-56.
 - Zingoni, A., Soto, H., Hedrick, J.A., Stoppacciaro, A., Storlazzi, C.T., Sinigaglia, F., D'Ambrosio, D., O'Garra, A., Robinson, D., Rocchi, M., Santoni, A., Zlotnik, A., Napolitano, M. (1998). **Cutting edge: The chemokine receptor CCR8 is preferentially expressed in Th2 but not Th1 cells.** *Journal of Immunology* 161, 547-551.
 - Zunino, M.P., Newton, M.N., Maestri, D.M., Zygadlo, J.A. (1998). **Essential oils of three *Baccharis* species.** *Planta Medica* 64, 86-87.
 - Zykwinska, A., Rondeau-Mouro, C., Garnier, C., Thibault, J.F., Ralet, M.C. (2006). **Alkaline extractability of pectic arabinan and galactan and their mobility in sugar beet and potato cell walls.** *Carbohydrate Polymers* 65, 510-520.

Páginas Web consultadas:

<http://www.niaid.nih.gov/topics/HIV/AIDS/Research/prevention/Pages/topicalMicrobicides.aspx>
<http://www.cdc.gov>
<http://www.pharmainformatic.com>
<http://www.taringa.net>
<http://www.maph49.galeon.com>
<http://www.ccrcc.uga.edu/~mao/rg1/rg1.htm>
<http://www.Floravascular.com>
<http://www.florasilvestre.es>
<http://www.fotonatura.org>
<http://www.botanical-online.com>
<http://www.globedia.com>
<http://www.herbolari73.blogspot.com>
<http://www.inaturalist.org>,
<http://www.phytoimages.siu.edu>.
<http://www.plantillustrations.org>